

Aus dem Institut für
Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik

Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg

**Entwicklung eines standardisierbaren Systems
zum quantitativen Nachweis von DNazym-Aktivität *in vitro*
für den Einsatz in der Therapie des allergischen Asthma bronchiale**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lisa Maria Casola, geb. Pertzborn
aus Bonn

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 22.08.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. H. Garn

1. Korreferent: Prof. Dr. F. Czubayko

Inhaltsverzeichnis

	<i>Seite</i>
1. Einleitung	7
1.1 Asthma bronchiale	7
1.1.1 Epidemiologie und volkswirtschaftliche Bedeutung	7
1.1.2 Ursachen und Einflussfaktoren	7
1.1.3 Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale	9
1.2 T-Helferzellen	12
1.3 Gegenwärtige Therapieoptionen bei allergischem Asthma bronchiale	15
1.3.1 β_2 -Sympathomimetika	17
1.3.2 Glukokortikoide	19
1.3.3 Leukotrienrezeptorantagonisten und Anti-IgE-Antikörper	20
1.4 Neue Therapieoptionen bei allergischem Asthma bronchiale	21
1.4.1 Zytokin-Antagonisten	21
1.4.2 Tiotropium	23
1.4.3 Antisense-Strategien	23
1.4.3.1 Small interfering RNA, Antisense Oligonukleotide und Ribozyme	24
1.4.3.2 DNAzyme	26
1.4.3.3 Probleme in der Quantifizierung des Effekts von DNAzymen	27
1.5 Zielstellung der Arbeit	29
 2. Material	 31
2.1 Zellkultur	31
2.1.1 Zelllinien	31
2.1.2 Zellkulturmaterialien	31
2.1.3 Zellkulturmedien und -zusätze	31
2.1.4 Transfektion	31
2.2 Chemikalien	32
2.3 Puffer	32
2.4 Kits	33
2.5 Klonierung	33
2.6 Plasmide	34
2.7 Primer	34

2.8 DNAzyme	34
2.9 Marker und Ladepuffer	35
2.10 Verbrauchsmaterialien	35
2.11 Geräte	35
2.12 Software	36
3. Methoden	37
3.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren	37
3.1.1 Aufreinigung von cDNA aus Agarosegel	37
3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden aus Bakterienkulturen	37
3.1.3 Aufreinigung von linearisierten Plasmiden nach Restriktionsverdau	38
3.1.4 Aufreinigung von RNA	38
3.1.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	39
3.2 Synthese, Amplifikation und Nachweis von DNA-Sequenzen	39
3.2.1 Reverse Transkription	39
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
3.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	40
3.3 Klonierung zur Konstruktion von Expressionsvektoren	41
3.3.1 Herstellung von Nährmedium und Nährboden für die Bakterienkultivierung	42
3.3.2 Restriktionsverdau	42
3.3.3 Ligation	43
3.3.4 Transformation	43
3.3.5 Amplifikation von Plasmiden aus Bakterienkulturen	43
3.3.6 Prinzip der TA-Klonierung	44
3.3.7 Sequenzierung	45
3.4 Zellkultur	45
3.4.1 Zelllinien	45
3.4.2 Zellzählung	46
3.4.3 Transfektion	47
3.4.3.1 Transfektion von Expressionsvektoren	47
3.4.3.2 Transfektion von DNAzym	48

3.4.4 Vitalitätsmessung nach Transfektion	49
3.4.5 Analyse der Transfektionseffizienz von DNazym mittels FACS	50
3.5 Untersuchung der Genexpression auf Proteinebene	51
3.5.1 Fluoreszenzmikroskopie	51
3.5.2 Konfokale Lasermikroskopie	51
3.5.3 Fluoreszenzspektroskopie	52
3.5.4 Lumineszenzspektroskopie	53
3.6 Statistische Auswertung	53
4. Ergebnisse	54
4.1 Konstruktion von Expressionsvektoren mit GATA-3	55
4.1.1 Nachweis einer erfolgreichen Konstruktion des mCherry-GATA-3-Vektors	56
4.1.2 Nachweis einer erfolgreichen Konstruktion des psiCheck-GATA-3-Vektors	61
4.2 Transfektion von HEK-293-Zellen mit den Expressionsvektoren	63
4.2.1 Nachweis einer erfolgreichen Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem mCherry-GATA-3-Vektor	63
4.2.2 Nachweis einer erfolgreichen Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor	71
4.3. Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem DNazym hgd40	75
4.3.1 Analyse der Zellvitalität nach Doppeltransfektion	76
4.3.2 Nachweis einer effizienten Transfektion des DNazyms	78
4.4 Suppression der Genexpression durch Behandlung mit hgd40	81
4.4.1 Suppression der Genexpression des mCherry-GATA-3-Vektors durch die Behandlung mit hgd40	81
4.4.2 Suppression der Genexpression des psiCheck-GATA-3-Vektors durch die Behandlung mit hgd40	81
5. Diskussion	85
5.1 Bisherige Testverfahren zur Analyse der Effizienz von DNazymen	86
5.1.1 Erstellung eines Testverfahrens mittels Reportersystemen	88

5.2 Einbringen von DNA in die Zellen	90
5.2.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie	90
5.2.2 Transfektion – Gratwanderung zwischen hohem Schutz und optimaler Freisetzung der DNA	92
5.2.3 Alternative Verfahren zur Einbringung von DNA in die Zellen	96
5.3 Bindung und Degradierung der RNA durch das DNAzym	97
5.3.1 Einfluss der Zielstruktur	97
5.3.2 Einfluss der DNAzym-Struktur	98
5.4 Expression der Zielstruktur	99
– Störfaktoren bei Transkription und Translation	
5.4.1 IRES im mCherry-GATA-3-Vektor: Einfluss auf die Genexpression	100
5.4.2 Beeinflussung der Expression der Firefly- und Renilla-Luciferase	101
5.5 Hindernisse bei der Signaldetektion	102
5.6 Ausblick	103
6. Zusammenfassung	105
7. Abkürzungsverzeichnis	109
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	112
9. Literaturverzeichnis	115
10. Verzeichnis der akademischen Lehrer	128
11. Danksagung	129

1. Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine episodisch auftretende Erkrankung, bei der es auf dem Boden einer Hyperreagibilität des Bronchialsystems und einer andauernden Entzündung der Atemwege zu immer wiederkehrender, reversibler Bronchialobstruktion und damit anfallsweise zu Atemnot, Husten und Engegefühl in der Brust kommt (GINA, 2007). Häufig chronifiziert die Erkrankung, was zum so genannten „Airway Remodelling“ mit irreversiblen strukturellen Veränderungen führt (Holgate, 2011; Siddiqui et al., 2007).

1.1.1 Epidemiologie und volkswirtschaftliche Bedeutung

Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Menschen, gerade in den industrialisierten Ländern.

2004 veröffentlichte die GINA (Global Initiative for Asthma) ihren Bericht über die weltweite Prävalenz des chronischen Asthma bronchiale. Gestützt auf die Daten der beiden größten internationalen und standardisierten Studien, der International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) und dem European Community Respiratory Health Survey (ECRHS), sowie einer Untersuchung von Masoli et al. werden in dieser Veröffentlichung für Deutschland Prävalenzen von 6,9% bei Erwachsenen und 10% bei Kindern und Jugendlichen genannt. Ähnlich ist die Situation in Ländern wie Österreich, Spanien und Italien (Masoli et al., 2004; GINA, 2004; ISAAC, 1998; ECRHS, 1996). In der Studie zur Gesundheit in Deutschland GEDA werden für die Bundesrepublik Prävalenzen von 5,9% für Frauen und 4,8% für Männer genannt (GEDA, 2009). Auf Basis ihrer eigenen Erhebungen und demographischer Daten der WHO geht die GINA davon aus, dass die Zahl der Asthmapatienten von aktuell 300 Millionen weltweit bis 2025 um weitere 100 Millionen ansteigen wird (GINA, 2011). Die Therapiekosten sind bereits jetzt beträchtlich. Das statistische Bundesamt veröffentlichte im Statistischen Jahrbuch für 2010 direkte Kosten von 786 Millionen Euro, die im Jahr 2006 für die Behandlung des Asthma bronchiale anfielen (Statistisches Bundesamt, 2010).

1.1.2 Ursachen und Einflussfaktoren

Henry Salter schlug bereits 1860 die Unterscheidung zwischen einer intrinsischen, nicht-allergischen und einer extrinsischen, allergischen Form vor (Salter, 1860; zitiert in

1. Einleitung

McFadden, 2004). Patienten, die an letzterer Form erkrankt sind, besitzen ein hyperreagibles Bronchialsystem, sodass der Kontakt mit normalerweise harmlosen Umweltantigenen, auch Allergene genannt, zu einer Immunglobulin (Ig) E-vermittelten allergischen Reaktion mit Bronchokonstriktion, vermehrter Schleimproduktion (Dyskrinie) und entzündlich-ödematöser Schwellung der Bronchialwand führt (s. 1.1.3). Die Frage ist nun, warum bei der extrinsischen Form der Kontakt mit den Antigenen bei Gesunden keine überschießende Immunantwort hervorruft, während der Allergiker Symptome bis hin zum anaphylaktischen Schock zeigen kann.

Ein Anknüpfungspunkt sind Unterschiede bezüglich der Lebensbedingungen und Umwelteinflüsse. Verschiedene Studien zeigten deutlich geringere Asthma-Prävalenzen in Agrargesellschaften im Vergleich zu Industrieländern (D'Amato et al., 2010; ISAAC, 1998). Der in den letzten Jahren beobachtete Trend einer scheinbaren Abnahme der Asthma-Prävalenz in der westlichen Welt entspricht nach neueren Studien nicht der Realität und ist eher auf bessere medizinische Versorgung zurückzuführen (Anandan et al., 2010). Jene Umwelteinflüsse scheinen besonders im Kindesalter einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsentstehung zu haben. So stellte David Strachan 1989 die so genannte Hygiene-Hypothese auf, die davon ausgeht, dass vermehrte Hygiene in den industrialisierten Gesellschaften zu vermindertem Kontakt mit Mikroben oder mikrobiellen Produkten führt, der zur Reifung des Immunsystems aber unerlässlich ist (Strachan, 1989).

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen diverser Studien in Deutschland, Österreich und der Schweiz Kinder und Erwachsene von Bauernhöfen mit solchen aus ländlicher Umgebung, jedoch ohne direkten Kontakt zu Bauernhöfen, verglichen. Für Letztere zeigten sich in allen drei Ländern signifikant höhere Prävalenzen bezüglich des Auftretens von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis (von Mutius und Radon, 2008; Riedler et al., 2001). Das Aufwachsen auf einem Bauernhof in früher Kindheit und ein Anhalten dieser Exposition bis ins Erwachsenenalter hinein scheint dabei einen additiven protektiven Effekt zu haben (Douwes et al. 2007; Schulze et al. 2007). Riedler et al. konnten außerdem einen Allergieschutz durch den Konsum von unbehandelter Kuhmilch zeigen (Riedler et al., 2001).

Andere Studien untersuchten den Zusammenhang von Adipositas und Asthma. Dabei zeigte sich ein negativer Einfluss der Übergewichtigkeit auf eine noch nicht etablierte Atemwegsobstruktion (Marcon et al., 2009), sowie auf die Wirksamkeit der

Asthmamedikamente (Sutherland et al., 2009). Auch im Mausmodell führte Adipositas zu einer verstärkten Entzündungsreaktion der Atemwege (Calixto et al., 2010).

Wie bei vielen chronischen Erkrankungen ist zudem die genetische Konstitution ein wichtiger Faktor. Ging man eine Zeit lang von direkt konsekutiven Beziehungen zwischen der Veränderung eines Gens und der allergischen Erkrankung aus, so ist heute die Hypothese multipler Interaktion zwischen Genen und Umwelteinflüssen („gene-by-environment-interaction“) vorherrschend (Ege et al., 2011).

1.1.3 Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Gell und Coombs teilten 1963 allergische Reaktionen in vier Typen (Coombs und Gell I-IV) ein. Bei allen vier Allergietypen führt ein Initialkontakt mit einem Allergen zu einer immunologischen Sensibilisierung. Allergietypische Symptome treten dann allerdings erst bei erneutem Allergenkontakt in der so genannten Effektorphase auf. Die beim Asthma bronchiale vorliegende Form wurde als Typ I-Allergie, oder auch Allergie vom Soforttyp, klassifiziert. Die Reaktion wird über Immunglobuline der Klasse E vermittelt. Bei der Typ II-Reaktion (zytotoxische Reaktion) werden Antigene auf Körperzellen fixiert, von Immunglobulinen der Klasse G und M gebunden und so für die Zelllyse durch natürliche Killerzellen und Makrophagen markiert. Die Typ III-Reaktion führt durch die Komplexbildung von Antikörpern mit löslichen Antigenen zur Verstopfung von Kapillaren mit den Folgen einer Entzündung. Die Typ IV-Reaktion ist antikörperunabhängig und läuft verzögert ab. Es kommt zur Aktivierung spezifischer T-Zellen und dadurch meist zur Zelllyse (Gell und Coombs, 1963).

Eine zentrale Rolle bei der Typ I-Allergie spielen T-Helferzellen (Th-Zellen), die das CD4-Oberflächenprotein tragen und nach Differenzierung zu allergiespezifischen T-Helferzellen des Subtyps Th2 weitere Effektorzellen des Immunsystems aktivieren können (Valenta, 2002).

Damit diese Differenzierung erfolgen kann, ist ein Kontakt der T-Helferzelle mit dem Antigen notwendig. Hierzu wird das Antigen von Antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie z.B. dendritischen Zellen (DC), Makrophagen oder B-Zellen, aufgenommen und intrazellulär prozessiert. Anschließend wird es an Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle der Klasse II gebunden und auf der Zelloberfläche als Fragment präsentiert (Vyas et al., 2008).

1. Einleitung

Die APC wandern hierzu in Lymphknoten ein, in denen sich die naiven CD4⁺-T-Helferzellen befinden (Hammad und Lambrecht, 2006). Es kommt zu einer Bindung zwischen dem CD4-Oberflächenprotein, dem spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) der T-Helferzelle und dem Komplex aus Peptid und MHC-II-Molekül (Rudolph et al., 2006). Auf diese Weise kann die T-Helferzelle das Antigen erkennen und sich weiter differenzieren. Sie benötigt dazu allerdings kostimulierende Signale. Die APCs besitzen zusätzlich einen speziellen Transmembranrezeptor aus der Immunglobulinsuperfamilie, das B7-Molekül. Die Bindung dieses Rezeptors an das CD28-Oberflächenprotein der T-Helferzelle führt zu deren Aktivierung und Ausschüttung von Zytokinen, welche eine weitere T-Zell-Differenzierung initiieren.

Verschiedene T-Helferzell-Subtypen sind charakterisiert durch die Ausschüttung verschiedener Zytokinmuster. Die CD28/B7-Interaktion bewirkt überwiegend die Differenzierung zu Th2-Zellen (Chen und Shi, 2006). Diese Subpopulation ist bei Allergikern im Überschuss vorhanden (Romagnani, 2006) und stimuliert durch die Produktion ihrer typischen Zytokine Interleukin (IL)-4 und IL-13 B-Zellen, die sich daraufhin zu Plasmazellen mit überschießender IgE-Antikörper-Produktion differenzieren (Valenta, 2002; s. Abb. 1). Das IgE entsteht durch einen Klassenwechsel des Antikörper-Isotyps (von IgG, IgM oder IgA) und ist spezifisch gegen das ursprüngliche Antigen gerichtet. Es kann an die extrazelluläre α -Domäne hochaffiner Fc ϵ I-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, sowie an niedrigaffine Fc ϵ II-Rezeptoren auf aktivierten Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten binden (Gould und Sutton, 2008; Gould et al., 2003), löst zunächst aber noch keine allergische Reaktion aus.

Erst bei wiederholtem Allergenkontakt findet über die IgE-Antikörper eine Kreuzvernetzung der Fc ϵ -Rezeptoren auf Mastzellen statt, die sich verstärkt in den hypertrophierten glatten Muskelzellen der Asthmatiker befinden (Brightling et al., 2002). Dadurch kommt es zu deren Degranulation mit massiver Freisetzung von Histamin, Serotonin, Prostaglandinen und Leukotrienen, die eine akute Vasodilatation, Dyskrinie und Bronchospasmus bewirkt (Frandsen et al., 2013; Hele et al., 2001). Die Vasodilatation führt zur Ödembildung sowie zur Gewebsinfiltration mit Histamin, Mastzellen und durch IL-5 aktivierten eosinophilen Granulozyten (Valenta, 2002), während die Konstriktion glatter Muskulatur die typische Obstruktion der oberen Luftwege mit Atemnot hervorruft.

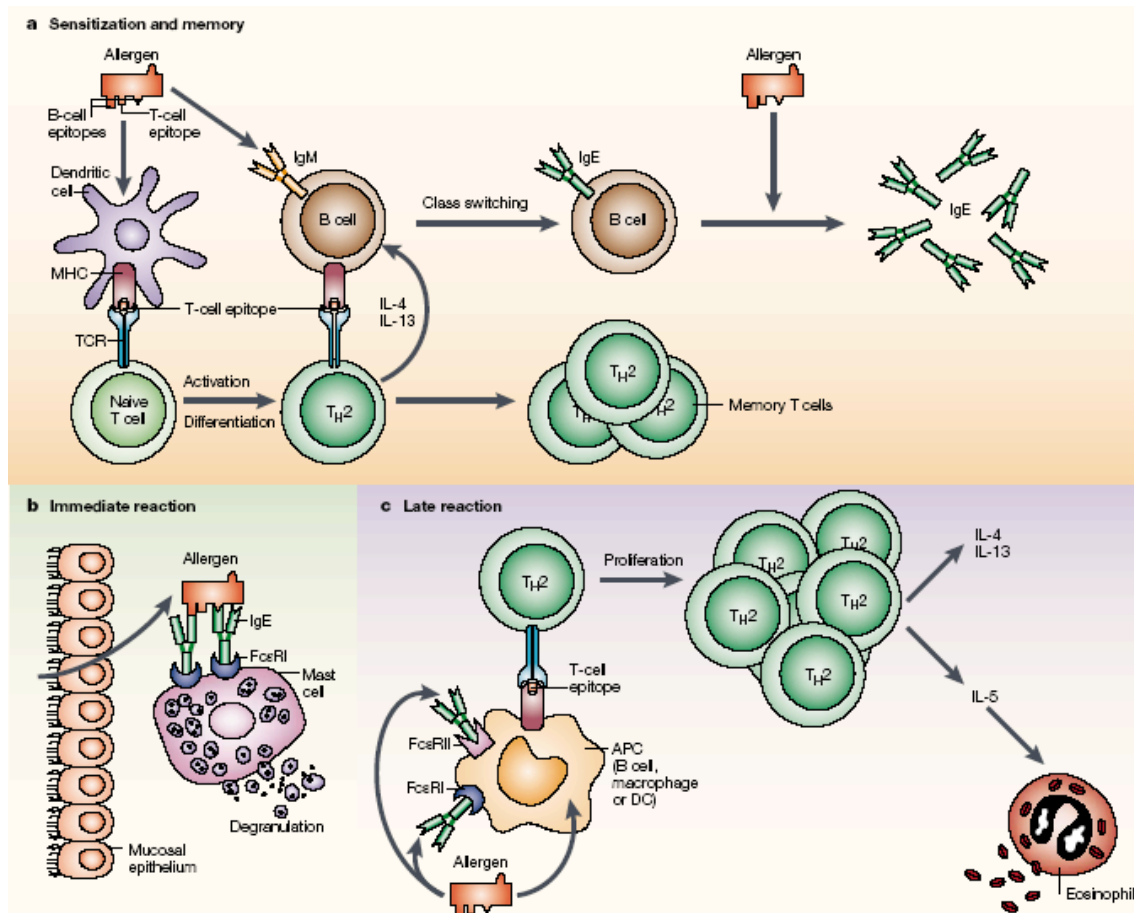


Abb. 1 Zelluläre und molekulare Mechanismen der Typ-I-Allergie (entnommen aus Valenta, 2002)

Verschiedene Vorgänge sorgen für eine Aufrechterhaltung und Verstärkung dieser Mediator-vermittelten Phase der allergischen Reaktion. Im Zytoplasma der Immunzellen gebildete und nach Aktivierung freigesetzte Leukotriene verstärken nicht nur Bronchokonstriktion und Schleimsekretion, sondern agieren darüber hinaus als chemotaktische Substanzen (Parmentier et al., 2012). Basophile Zellen sind ebenfalls durch die Rekrutierung weiterer Zellen am Ablauf der Reaktion beteiligt, prozessieren aber auch selbst Antigene, um sie über den MHC-II zu präsentieren (Nakanishi, 2010). In ähnlicher Art und Weise wie Mastzellen können sie die allergische Reaktion regulieren, indem sie die Migration, Reifung und Funktion der beteiligten Zellen, wie beispielsweise der DCs und Th-2-Zellen durch Sekretion von IL-4 und IL-13 beeinflussen (Holgate, 2012; Galli et al., 2005).

Die durch die Mediatoren der Frühphase rekrutierten Lymphozyten, Makrophagen, eosinophilen und basophilen Granulozyten können nach 6-72 Stunden eine inflammatorische Spätphase einleiten (Murdoch und Lloyd, 2010; Holgate und Polosa, 2008). Aber auch die Bronchialepithelien, Fibroblasten und glatte Muskelzellen sind in der Lage, die Reaktion über Interaktion mit und Synthese von Entzündungsmediatoren

selbst in Abwesenheit exogener Stimuli zu unterhalten (Loubaki et al., 2013; Camoretti-Mercado, 2009). So kann es im Verlauf zu einer dauerhaften Entzündung des Respirationstrakts kommen. Diese ist von großer Bedeutung für den chronischen Verlauf des Asthma bronchiale, da sie auf lange Sicht häufig zum „Airway Remodelling“ führt. Hierzu zählen fibroblastischer Umbau, Verdickung der glatten Muskulatur, Verdickung der glatten Muskulatur durch Hypertrophie und Hyperplasie, Angiogenese und Vermehrung der Schleim-produzierenden Becherzellen (Bergeron et al., 2009; Holgate und Polosa, 2008).

1.2 T-Helferzellen

Die an der allergischen Reaktion beteiligten $CD4^+$ T-Helferzellen lassen sich anhand ihres Zytokinmusters in verschiedene Subpopulationen unterteilen. Im Folgenden soll die Differenzierung zu T-Helferzellen des Subtyps Th1 und solchen des Subtyps Th2 beleuchtet werden (s. Abb. 2), eine Unterscheidung, die erstmals 1986 von Mosmann vorgenommen wurde (Mosmann, 1986).

Durch die Stimulation der naiven T-Helferzellen durch die APCs wird eine autokrine Reaktion der sich entwickelnden T-Zellen mit typischer Zytokinsekretion ausgelöst (Zhu et al., 2010). Zur Ausbildung der Th1-Zellen kommt es durch Einfluss von IL-12 und $IFN-\gamma$. Sie sind hauptsächlich der zellulären Immunantwort zugeordnet und sezernieren dazu $IFN-\gamma$, IL-2, $TNF-\alpha$ und $TNF-\beta$ (Szabo et al., 2003). Th2-Zellen sind von Bedeutung für die Regulation der humoralen Immunantwort und bei der Abwehr von Parasiten. Sie entstehen durch den Einfluss vor allem von IL-4. Zur Rekrutierung weiterer Immunzellen schütten sie später IL-4, IL-5 und IL-13 aus (Ansel et al., 2006). Durch die jeweils gebildeten Zytokine ergibt sich eine positive Rückkopplung bei der Differenzierung zu Th1-Zellen oder zu Th2-Zellen.

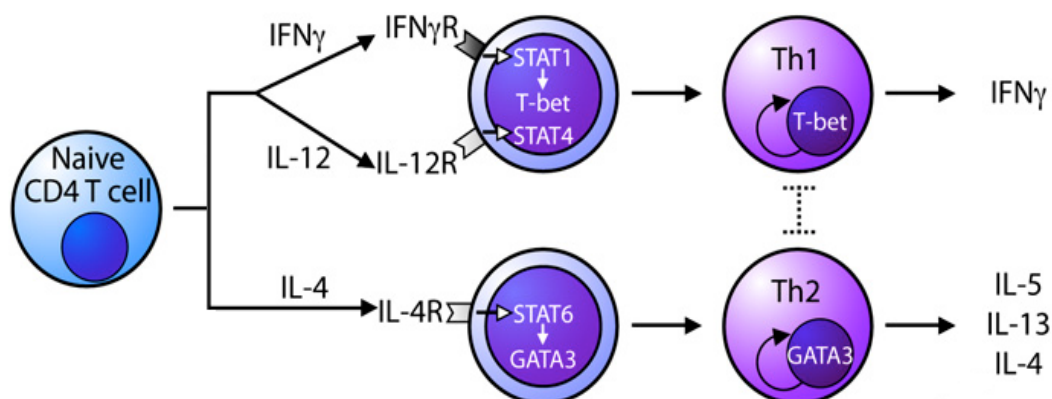


Abb. 2 Differenzierung der Th-1- und Th-2-Zellen (entnommen aus Chatila et al., 2008)

1. Einleitung

Zusätzlich zu diesen autokrinen Vorgängen existieren weitere Mechanismen, die regulierend auf die Differenzierung der Th-Zellen wirken. Auch negative Feedbackschleifen sind möglich. So kann das Vorliegen eines bestimmten Zytokinmilieus die Differenzierung in die eine oder andere Subpopulation unterdrücken. Beispielsweise hat IFN- γ in hohen Dosen einen supprimierenden Effekt auf die Ausbildung einer Th2-dominierten Reaktion, während es in niedrigen Dosen eine Entwicklung von IL-4-sezernierenden Th2-Zellen begünstigt (Singh und Agrewala, 2006). Obwohl es sich bei IL-4 um ein Th2-typisches Interleukin handelt, wurde ein positiver Effekt auf die Produktion des Th1-typischen IL-12 beobachtet (Lyakh et al., 2008). Beeinflusst wird die Höhe der Interleukinproduktion auch davon, ob es sich bei den APC um B-Zellen, Makrophagen oder dendritische Zellen handelt (Singh und Agrewala, 2006).

Zudem scheinen weitere körpereigene Substanzen, wie beispielsweise die Sexualhormone, einen Einfluss auf die Zytokinproduktion zu haben (Young-Cheol, 2008). Die so genannten regulatorischen T-Zellen (Treg) sollen an dieser Stelle nur am Rande erwähnt werden. Sie produzieren unter anderem IL-10, das inhibitorisch auf die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen wirkt (Young-Cheol, 2008).

Diese und weitere Regulationsmechanismen sorgen beim Gesunden für ein ausgewogenes Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen. Menschen, die hingegen an einer Autoimmunerkrankung oder auch unter Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation leiden, zeigen erhöhte Th1-Spiegel, während Patienten mit Allergien, so auch Asthmatiker, hohe Th2-Werte aufweisen. Man findet bei Letzteren somit auch erhöhte Zytokinkonzentrationen entsprechend dem Th2-typischen Muster (Romagnani, 2006; Romagnani, 1997).

Die geschilderte T-Helferzell-Differenzierung wird auf intrazellulärer Ebene über Signalfade vermittelt, die zur Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren führen. Dabei handelt es sich um DNA-bindende Proteine, die sich in der Promotorregion ihres Zielgens anlagern um dessen Transkription je nach Art des Faktors zu erhöhen oder zu supprimieren. Diese Einflussnahme auf das Zielgen geschieht längerfristig und meist durch zusätzliche Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren (Zhu et al., 2010).

Dazu binden die Transkriptionsfaktoren entweder direkt an ihre Ziel-DNA (Wang J et al., 2011) oder bewirken durch Modifikation der umgebenden Histone im Falle einer Transkriptionssteigerung eine Auflockerung der Chromatinstruktur um den Zugang zur DNA zu erleichtern (Perrella et al., 2013; Berger, 2007). Die Aktivität dieser Faktoren

1. Einleitung

wird ihrerseits ebenfalls durch unterschiedliche Regulationsmechanismen kontrolliert. Hierzu zählt beispielsweise die intranukleäre Bindung von Glukokortikoiden, die darüber hinaus auch selbst als Transkriptionsfaktoren für das entsprechende Ziel-Gen fungieren können (Trevor und Deshane, 2014).

Einige Transkriptionsfaktoren sind für allgemeine Transkriptionsvorgänge notwendig und daher in jeder Zelle vorhanden (Reese, 2006; Thomas und Chiang, 2003). Bei anderen handelt es sich um die bereits erwähnten spezifischen Transkriptionsfaktoren, die nur auf bestimmte Gene wirken und nur in bestimmten Zelltypen exprimiert sind. So ist bei der Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu Th2-Zellen und bei der Sekretion ihrer typischen Zytokine der spezifische Transkriptionsfaktor GATA-3 von besonderer Bedeutung (Zhu et al., 2006; Ray und Cohn, 1999).

Die Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren besteht aus 6 Mitgliedern (GATA-1-6), die unterschiedliche molekulare Strukturen aufweisen. Die Typen 1-3 wurden hauptsächlich im hämatopoetischen System (Bresnick et al., 2012), aber auch in Herz und Darm gefunden, während die Typen 4-6 sich in Geweben befinden, die endodermalen Ursprungs sind. GATA-3, GATA-4 und GATA-6 konnten in Bronchialbiopsien identifiziert werden (Caramori et al., 2001). Dabei hat das Zinkfingerprotein GATA-3 eine spezielle Position bei der Initiierung der Differenzierung zu Th2-Zellen (Guo et al., 2014) und ist bei Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden verstärkt nachweisbar. GATA-4 und GATA-6 wurden ebenfalls in bronchialen Monozyten entdeckt, jedoch ist ihre Zahl bei Asthmatikern nicht erhöht (Caramori et al., 2001; Nakamura et al., 1999).

Zu einer gesteigerten Expression von GATA-3 und damit zum Überwiegen der Th2-Zellen kommt es über einen Signalweg, der von IL-4 angestoßen wird. Das Zytokin bindet an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der T-Helferzellen und löst über die Janus-Kinasen (JAK) 1 und 3 eine Phosphorylierung und Dimerisierung und damit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 (signal transducer and activator of transcription) aus (Walford und Doherty, 2013; Goenka und Kaplan, 2011). STAT6 kann so an die Promotorregion der für GATA-3 kodierenden DNA binden und dadurch die Expression von GATA-3 erhöhen (Chatila et al., 2008). Das Protein GATA-3 wiederum besitzt einen kurzen Aminosäureabschnitt, der es zur Aufnahme in den Zellkern befähigt, wo es selbst als Transkriptionsfaktor für die Synthesesteigerung von IL-4 fungieren kann (s. Abb. 3). Letztlich induziert GATA-3 die Expression aller Th2-

typischen Zytokine IL-4, -5 und -13 und ist absolut notwendig für deren Expression (Aggarwal und Agrawal, 2014).

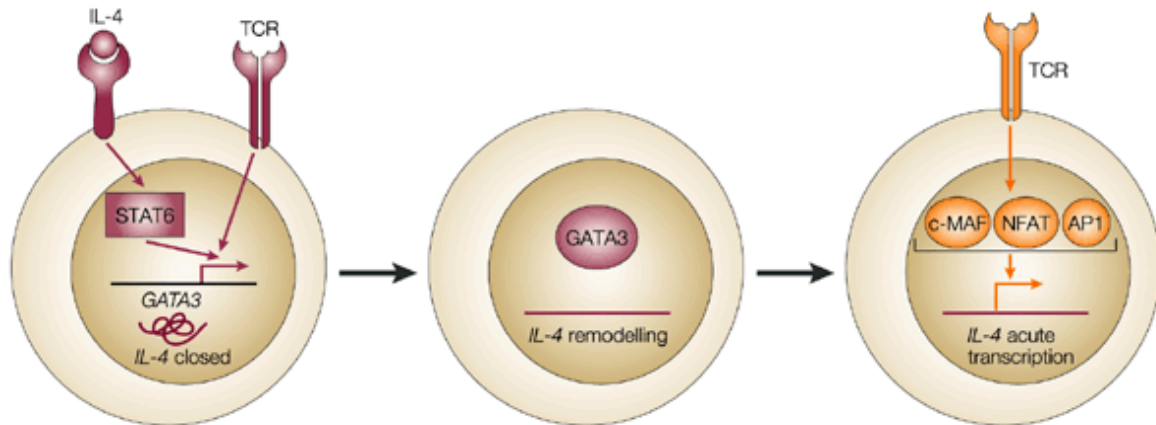


Abb. 3 Induktion der IL-4-Expression in Th-2-Zellen (entnommen aus Murphy und Stephen, 2002)

GATA-3 ist in der Lage, seine eigene Produktion durch positive Rückkopplung zu verstärken und gleichzeitig die der Th1-typischen Zytokine zu vermindern. Somit wird die Differenzierung zu Th2-Zellen begünstigt (Chatila et al., 2008). Andererseits können Faktoren der Th1-Entwicklungskaskade das Gleichgewicht in Richtung Th1-Zellen verschieben. So bindet der Th1-typische Transkriptionsfaktor t-bet an GATA-3 und verhindert darüber dessen Einflussnahme auf die DNA (Hwang und Szabo, 2005). Trotz dieser sich gegenüberstehenden Mechanismen, mit denen GATA-3 und t-bet die T-Helferzellendifferenzierung beeinflussen, konnten Jenner et al. 2009 einen gemeinsamen Pool von Zielgenen nachweisen, mit dem die beiden Transkriptionsfaktoren auf die Entwicklung der Th-Subpopulationen einwirken können (Jenner et al., 2009)

1.3 Gegenwärtige Therapieoptionen bei allergischem Asthma bronchiale

Zurzeit werden in der Therapie des chronischen Asthma bronchiale sowohl nicht-medikamentöse als auch medikamentöse Strategien angewandt. Bei den nicht-medikamentösen Optionen handelt es sich um die Lebensgewohnheiten betreffende Ansätze, wie beispielsweise eine Allergenreduktion durch Verwendung von speziellen Matratzen bei Hausstauballergikern (Visitsunthorn et al., 2010).

Die medikamentösen Strategien beruhen bisher auf keinem kausalen Ansatz, sondern stellen lediglich eine Einflussnahme auf die akuten Symptome dar. Davon bleibt die prognoseverbessernde und häufig sogar kurative spezifische Immuntherapie SIT ausgenommen, die eingesetzt werden kann, wenn das auslösende Allergen,

1. Einleitung

beispielsweise Pollen oder Hausstaub, genau bekannt ist. Über einen Zeitraum von meist drei Jahren wird nach einem festgesetzten Schema das Allergen in steigender Konzentration zugeführt, um auf diese Weise eine Toleranzentwicklung des Immunsystems zu bewirken (Holgate und Polosa, 2008).

Der Erfolg wird kontrovers diskutiert, es gibt aber Studien, die eine signifikante Verbesserung der Allergie unter Inkaufnahme möglicher unerwünschter Wirkungen wie anaphylaktischer Reaktionen zeigen können (Abramson et al., 2003). Ist die auf diese Weise erzeugte Toleranz einmal erreicht, kann sie über Jahre hinweg aufrechterhalten werden (Durham et al., 2010).

Die übliche medikamentöse Therapie bei chronischem Asthma bronchiale ist jedoch weder in der Lage, Toleranz des Immunsystems gegenüber Allergenen im Sinne einer Heilung zu erzeugen, noch hat sie längerfristigen Einfluss auf die Prognose und den Krankheitsverlauf (Guilbert et al., 2006; Ward und Walters, 2005). Sie setzt vielmehr an der makroskopischen Manifestation der allergischen Reaktion an und versucht, die Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Entzündungsreaktion zu vermindern.

Die beiden wichtigsten Substanzgruppen sind die β_2 -Sympathomimetika und die Glukokortikoide. In den Leitlinien der GINA finden zusätzlich Leukotrienrezeptor-antagonisten, Tiotropium, Anti-IgE- und Anti-IL-5-Antikörper sowie Theophyllin Anwendung (GINA 2016, s. Tabelle 1). Die letztgenannte Substanz hat in den aktuellen Empfehlungen aufgrund ihres ungünstigen Nebenwirkungsprofils an Bedeutung verloren, kann aber nach Abwägung und insbesondere bei schweren Formen in niedriger Dosis ab einem Alter von 12 Jahren eingesetzt werden. (GINA 2016; Barnes, 2010). Ist ein bestimmter Phänotyp bekannt, kann außerdem eine entsprechend spezifischere Therapie versucht werden. So kommt beispielsweise bei schwerem eosinophilem Asthma der Anti-IL-5-Antikörper Mepolizumab zum Einsatz (s. 1.4.1).

In der Praxis werden diese Medikamente einem Schema zugeordnet, das zwischen „Relievern“ und „Controllern“ unterscheidet. Die „Reliever“ entsprechen dabei der Notfallmedikation im akuten Asthmaanfall, während die „Controller“ ab einem gewissen Schweregrad „in guten wie in schlechten Zeiten“ täglich eingenommen werden müssen (Deutsche Atemwegsliga, 2006).

Die frühere Einteilung in 4 Schweregrade je nach Häufigkeit der tagsüber oder nächtlich bestehenden Symptome wird nicht mehr angewandt. Vielmehr sieht die aktuelle Leitlinie der GINA von 2016 eine therapeutische Vorgehensweise in Stufen bis zur Kontrolle der Erkrankung vor. Unter die Definition einer ausreichenden Kontrolle fallen

1. Einleitung

nach wie vor die Asthma-typischen Symptome tagsüber und nachts, aber auch die Einschränkung von Alltagsaktivitäten, Parameter der Lungenfunktionstestung und der wöchentliche Bedarf an Reliever-Medikamenten (GINA, 2016). Die Patienten müssen daher nicht nur im Umgang mit der Erkrankung und in der Anwendung der therapeutischen Maßnahmen, sondern auch in der regelmäßigen Überprüfung einer ausreichenden Krankheitskontrolle geschult werden. Sollte Letztere nicht erreicht sein, ist eine Höherstufung notwendig. Ebenso ist bei guter Kontrolle eine Deeskalation der medikamentösen Therapie möglich (GINA 2016).

Tabelle 1: Behandlungsstufen des chronischen Asthma bronchiale

(modifiziert nach GINA „Global strategy for asthma management and prevention“, 2016)

Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4	Stufe 5
ICS niedrig dosiert erwägen	ICS niedrig dosiert	ICS niedrig dosiert + LABA	ICS mittel- bis hoch dosiert + LABA	Überweisung für eine add-on-Therapie, z.B. Anti-IgE-AK (Omalizumab) <i>oder</i> Anti-IL5-AK (Mepolizumab)
	<i>oder</i> LTRA	<i>oder</i> ICS mittel- bis hoch dosiert	Zusätzlich Tiotropium	Zusätzlich Tiotropium
	<i>oder</i> Theophyllin niedrig dosiert	<i>oder</i> ICS niedrig dosiert + LTRA	<i>oder</i> ICS hoch dosiert + LTRA	Zusätzlich OCS in niedriger Dosis
		<i>oder</i> ICS niedrig dosiert + Theophyllin	<i>oder</i> ICS hoch dosiert + Theophyllin	
Bei Bedarf: kurzwirksame β_2 -Sympathomimetika			Bei Bedarf: kurzwirksame β_2 -Sympathomimetika <i>oder</i> ICS niedrig dosiert <i>oder</i> Formoterol	
Schulung, Kontrolle der auslösenden Faktoren				

Abkürzungen: AK = Antikörper, ICS = inhaled corticosteroids, LABA = long acting beta agonists, LTRA = leukotriene receptor antagonist, OCS = oral corticosteroids, RABA = rapid acting beta agonists

1.3.1 β_2 -Sympathomimetika

Bei den β_2 -Sympathomimetika handelt es sich um Pharmaka, die wie die körpereigenen Stoffe Adrenalin und Noradrenalin an adrenerge Rezeptoren des autonomen sowie zentralen Nervensystems binden und dort agonistisch, also aktivierend, wirken können. Ahlquist unterschied 1948 erstmals den α - vom β -adrenergen Rezeptortyp (Ahlquist, 1948). Später wurde dann eine weitere Unterteilung in Subtypen (α_{1A} , α_{1B} , und α_{1D} , α_{2A} ,

1. Einleitung

α_{2B} und α_{2C} bzw. β_1 , β_2 und β_3) vorgenommen (Perez und Doze, 2011). An Blutgefäßen, Neuronen des autonomen und zentralen Nervensystems und Thrombozyten finden sich Rezeptoren des α -adrenergen Typs (Chan et al., 2014; Rank et al., 2011; Perez und Doze, 2011; Xiang, 2008), während die Herzmuskulatur β_1 - und die glatte Bronchialmuskulatur β_2 -Rezeptoren aufweisen (Chan et al., 2014; Hizawa, 2009).

Im Bezug auf das Asthma bronchiale sind pulmonale adrenerge β_2 -Rezeptoren von Bedeutung, deren Aktivierung eine Relaxation der Bronchialmuskulatur zur Folge hat, die durch eine G-Protein-vermittelte Kaskade mit konsekutivem cAMP-Anstieg vermittelt wird (Holgate und Polosa, 2008). Diese Veränderungen konnten in klinischen Studien als Verbesserung der typischen Asthma-Symptome sowie der messbaren Lungenfunktion festgestellt werden (Maris et al., 2005; Nightingale et al., 2000).

Es gibt kurzwirksame β_2 -Sympathomimetika (RABA = rapid acting beta agonists), die zur Anfallskupierung, und langwirksame β_2 -Sympathomimetika (LABA = long acting beta agonists), die als Controller eingesetzt werden. Substanzen, die sich als besonders spezifisch für die β_2 -Rezeptoren erwiesen haben und dementsprechend häufig eingesetzt werden, sind Salbutamol und Fenoterol als RABA bzw. Salmeterol und Formeterol als LABA (GINA, 2007; Leitlinien der Deutschen Atemwegsliga, 2006). Die Empfehlungen der GINA sehen dabei in der Dauertherapie stets eine Kombination der LABA mit inhalativen Glukokortikoiden vor (GINA 2007), um so eine rasche Bronchorelaxation (Aalbers et al., 2010) und einen antiinflammatorischen Effekt (s.1.3.2) zu erzielen.

Der Vorteil der inhalativen Einnahme der β_2 -Sympathomimetika besteht in der lokalen und damit relativ nebenwirkungsarmen Anwendung. Trotz der Spezifität für β -Rezeptoren des Untertyps 2 ist allerdings eine systemische Wirkung auf andere adrenerge Rezeptoren und damit das Auftreten unerwünschter Wirkungen wie Blutdruckerhöhung, Tachykardie, Palpitationen, Herzrhythmusstörungen und Tremor (s. Tab. 2) möglich (Kallergis et al., 2005; Lipworth und McDevitt, 1992; Wong et al., 1990). Es wird deutlich, dass gerade der negative Einfluss auf das kardiovaskuläre System eine Rolle spielt, sodass der Einsatz von β_2 -Sympathomimetika bei Vorliegen entsprechender Grunderkrankungen genau bedacht werden sollte. In diesem Zusammenhang konnten unerwünschte Effekte bis hin zu tödlichen Ereignissen wie dem plötzlichem Herztod (Burggraaf et al., 2001) beobachtet werden (s. Tab. 2).

Auch in den Bronchien selbst kann es zu unerwünschten Wirkungen kommen. Die dauerhafte Monotherapie langwirksamer β_2 -Sympathomimetika kann zu bronchialer

1. Einleitung

Hyperreaktivität und einer gesteigerten bronchialen Entzündungsreaktion führen (Cazzola und Matera, 2007), weshalb man sie stets mit antiinflammatorisch wirksamen inhalativen Glukokortikoiden kombinieren sollte (s. 1.3.2). Des Weiteren hat man unterschiedliche Haplotypen des β_2 -Rezeptors gefunden und die Reaktion der entsprechenden Probanden auf die Inhalation von Salbutamol getestet. Je nach vorliegendem Polymorphismus kam es akut zu einer stärkeren systemischen Reaktion, wie beispielsweise zum Blutdruckabfall durch Vasodilatation (Lee et al., 2004).

Eines der größten Probleme bei längerer Anwendung stellt die Desensibilisierung des β -adrenergen Rezeptorsystems und die damit verbundene Toleranzentwicklung dar, die zum Wirksamkeitsverlust des Medikaments führt (Nino et al., 2009).

Tabelle 2 Mögliche systemische Nebenwirkungen der gebräuchlichsten β_2 -Sympathomimetika

(modifiziert aus: Diamant, 2007 und den genannten Quellen)

Wirkstoff	Fenoterol	Salbutamol	Salmeterol	Formeterol
Wirkdauer	Kurz	Kurz	Lang	Lang
Mögliche systemische Wirkungen	Tremor ^c Tachykardie ^b Palpitationen ^c Störungen der kardialen Erregung ^{b,c}	Tremor ^{b,c} Tachykardie ^b Palpitationen ^c Störungen der kardialen Erregung ^{a,b,c} Plötzlicher Herztod ^d Hypotonie ^f	Tremor ^b Tachykardie ^b Bronchiale Hyperreaktivität ^e Bronchiale Inflammation ^e	Tremor ^b Tachykardie ^b Bronchiale Hyperreaktivität ^e Bronchiale Inflammation ^e

a) Kallergis, 2005 b) Lipworth, 1992 c) Wong, 1990 d) Burggraaf, 2001 e) Cazzola, 2007 f) Lee, 2004

1.3.2 Glukokortikoide

Glukokortikoide werden im Körper über mehrere Schritte aus Cholesterin in der Nebennierenrinde gebildet und haben neben ihrer katabolen Stoffwechselwirkung auch Einfluss auf den Elektrolythaushalt und das autonome wie zentrale Nervensystem.

Der zytosolische Glukokortikoidrezeptor (GR) ist durch die Assoziation mit dem Hitzeschockprotein hsp90 inaktiviert. Erst durch Bindung des Substrats diffundiert hsp90 ab und der nun aktivierte Rezeptor kann in den Zellkern gelangen um sich nach Bildung eines Homodimers an die DNA im Bereich der Glucocorticoid sensitive region (GSR) einer Vielzahl von Genen anzulagern. Dadurch kommt es zu einer Beeinflussung der Transkriptionsrate dieser Gene, die entweder direkt oder indirekt über die Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren erfolgt (Barnes, 2006).

In therapeutischer Dosierung unterdrücken sie die Synthese von Entzündungsmediatoren bzw. steigern die von antiinflammatorischen Proteinen (Barnes, 2006; Barnes und Adcock 2003). Diese Wirkungen macht man sich bei der Behandlung des chronischen Asthma bronchiale zunutze, indem man Glukokortikoide wie Budesonid oder Fluticason je nach Schweregrad in unterschiedlichen Dosen inhalativ oder oral einsetzt (GINA, 2016).

Trotz nachgewiesener Verbesserung von Symptomen, Lungenfunktion und Verlauf (Guilbert et al., 2006; McMillan et al., 2005) sind insbesondere bei systemischer und längerfristiger Anwendung die Nebenwirkungen problematisch. Es kann zu Osteoporose mit erhöhtem Frakturrisiko (van Staa et al., 2000), gastrointestinalen Ulcera und Blutungen (Hansen et al., 2008), Nebennierenrindensuppression, Gewichtszunahme, Verstärkung oder Neuauftreten eines Diabetes mellitus, Schwächung des Immunsystems, kardio-vaskulären Erkrankungen, psychischen Schwankungen (van Raalte und Diamant, 2014; Liu et al., 2013), Wachstumsverzögerung bei Kindern (Guilbert et al., 2006) und Kataraktbildung (Smeeth et al., 2003) kommen. Bei inhalativer Anwendung sind zudem Heiserkeit und Pilzbesiedlung im Rachenraum und Ösophagus nicht selten (Kang et al., 2013; Aun et al., 2009). In sehr hohen Konzentrationen kann sich eine sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz oder ein Cushinoides Syndrom mit Osteoporose, diabetischer Stoffwechsellage und Hypertonie, Vollmondgesicht, Stammfettsucht und Büffelnacken entwickeln (Tsoukas et al., 2014). Hinzu kommt, dass ein gewisser Anteil der Patienten nicht auf die Therapie mit Glukokortikoiden anspricht. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Gruppe, die erhöhte Konzentrationen von neutrophilen Granulozyten aufweist (Ito et al., 2008). Letztlich bleibt die Therapie mit Glukokortikoiden eine symptomatische, die zwar die Inflammation der Atemwege eindämmen, deren Remodelling aber nicht aufhalten kann (Caramori et al., 2008).

1.3.3 Leukotrienrezeptorantagonisten und Anti-IgE-Antikörper

In den letzten Jahren wurden zu den hauptsächlich eingesetzten β_2 -Sympathomimetika und Glukokortikoiden ergänzend Leukotrienrezeptorantagonisten (LTRA) und Anti-IgE-Antikörper (Omalizumab) etabliert. Letzteres Präparat bindet freies IgE, sodass dieses nicht mehr kreuzvernetzen und zur Degranulation der Mastzellen führen kann. Auf diese Weise wird die Histamin-vermittelte allergische Reaktion verhindert (Normansell et al., 2014). Aktuell beschränkt sich der Einsatz von Omalizumab noch

auf Patienten, die mit der herkömmlichen Medikation keine ausreichende Symptomkontrolle erreichen. Grund dafür ist zum einen, dass die Wirksamkeit des Präparats bestimmte IgE-Spiegel und auch ein maximales Gewicht des Patienten erfordert. Zum anderen ist die Therapie noch recht teuer und kann zu gravierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen. Hierzu zählen parasitäre Infektion durch die Unterdrückung von IgE oder der anaphylaktische Schock (Incorvaia et al., 2008).

Leukotrienrezeptorantagonisten greifen erst nach Degranulation der Mastzellen in die allergische Reaktion ein. Leukotriene sind Entzündungsmediatoren, die in den Mastzellen, aber auch in anderen Leukozyten-Subgruppen wie eosinophilen Granulozyten, produziert werden (s. 1.1.3). In der Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale verstärken sie die entzündlichen Veränderungen und Hypersekretion in den Bronchien über eine Rezeptorbindung an der Zelloberfläche. Dies endet schließlich im Remodelling. Sie wirken bronchokonstriktiv und chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten (Niimi, 2013). Leukotrienrezeptorantagonisten steuern diesen Vorgängen entsprechend entgegen und reduzieren außerdem nachweislich die Plasmaspiegel der Th-2-spezifischen Zytokine, sodass eine weitere Differenzierung zu Th2-Zellen verhindert wird (Caramori et al., 2008). Dennoch wird der Einsatz von LTRA zum einen durch die hohen Kosten, aber auch durch die in Studien erwiesene Unterlegenheit gegenüber inhalativen Glukokortikosteroiden limitiert. Es wird bei unzureichender Symptomkontrolle ergänzend zur Standardtherapie angewandt. Außerdem wird das oral verfügbare Präparat bei Kindern eingesetzt, die nicht in der Lage sind, Glukokortikosteroide zu inhalieren oder deren Eltern eine Anwendung von Kortison aus Angst vor den möglichen Nebenwirkungen, wie die Hemmung des Längenwachstums, nicht tolerieren (Hon et al., 2014).

1.4 Neue Therapieoptionen bei allergischem Asthma bronchiale

1.4.1 Zytokin-Antagonisten

Am Beispiel der LTRA wird deutlich, dass zum Erreichen einer dauerhaften Symptomkontrolle die Entzündungsreaktion in den Bronchien unterbunden werden muss. Neuere Therapiekonzepte haben daher die an der Reaktion beteiligten Immunzellen und deren Mediatoren zum Ziel.

So wurden Antikörper gegen die Zytokine IL-4, -5 und -13 und/oder deren Rezeptoren entwickelt. Diese Interleukine vermitteln nach Rezeptorbindung proinflammatorische Vorgänge (s. 1.1.3 und 1.2). Bindung monoklonaler Antikörper der Zytokine oder deren

Rezeptoren blockiert diese Reaktionen und verhindert damit die Ausbildung einer chronischen bronchialen Entzündung. Diese Präparate zeigten in Tiermodellen vielversprechende Resultate (Walsh, 2012). In klinischen Studien waren sie allerdings nur bei bestimmten Phänotyp-Subgruppen mit moderatem bis schwerem Asthma und einer persistierenden Eosinophilie der Atemwege wirksam (Menzella et al., 2015). Aktuell sind in Europa mit Mepolizumab und Reslizumab zwei Anti-IL-5-Antikörper als add-on-Therapie für diese Indikation zugelassen.

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin ist der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), der eine zentrale Position in der Pathogenese verschiedener chronisch-entzündlicher Erkrankungen einnimmt. In den Atemwegen wird er hauptsächlich in Mastzellen gebildet und spielt so auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der allergisch-entzündlichen Reaktion des Asthma bronchiale. Entsprechend wurden TNF- α -Antagonisten entwickelt, die besonders bei Untergruppen therapierefraktärer Asthmatiker ihre Anwendung fanden. Trotz des Therapieerfolgs bei diesen Patienten ist der Einsatz aufgrund teilweise schwerwiegender Nebenwirkungen, wie z.B. ernsthafter Infektionen, kritisch zu betrachten (Brightling et al., 2008).

Analog wurden Antikörper gegen den Transformierenden Wachstumsfaktor $\beta 1$ (*englisch* transforming growth factor oder TGF- $\beta 1$) generiert. TGFs fungieren als Mediatoren in der Differenzierung von Zellen und Gewebe. TGF- $\beta 1$ wird unter anderem von eosinophilen Granulozyten sezerniert, die an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligt sind. Er trägt zur subepithelialen Fibrosierung und Verdickung der glatten Muskulatur in den Bronchien bei. Des Weiteren wird über die eosinophilen Granulozyten und TGF- $\beta 1$ ein Mechanismus begünstigt, der sich Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) nennt. Er beschreibt den Verlust der Polarität und dadurch der Adhäsion der Epithelzellen, sodass diese mesenchymale Eigenschaften und damit die Fähigkeit zur Migration erlangen. Dies wiederum führt zu einer Störung der natürlichen Barriere, die das Atemwegsepithel gegenüber Allergenen bietet. Entsprechend wird die dauerhafte inflammatorische Reaktion über deren Penetration verstärkt und weiter unterhalten (Kudo et al., 2013). Insgesamt führen die beschriebenen Vorgänge zum bereits erwähnten Remodelling. Über eine Applikation von TGF- $\beta 1$ -Antikörpern konnte im Mausmodell eine deutliche Reduktion der bronchialen Entzündung und Dicke der Bronchialwände nachgewiesen werden (Yasukawa et al., 2013). Weitere Zytokin-Antagonisten wurden bisher *in vitro* oder in Tiermodellen getestet und werden zum Teil bereits zur Behandlung anderer allergischer

Erkrankungen, wie z.B. der allergischen Rhinitis, vermarktet. Der klinische Einsatz zur Therapie des allergischen Asthma bronchiale ist größtenteils noch nicht erfolgt (Caramori et al., 2008).

1.4.2 Tiotropium

Eine weitere neue Therapieoption bei durch ICS/LABA unzureichend kontrolliertem Asthma bronchiale ist Tiotropium. Es handelt sich hierbei um ein langwirksames Anticholinergikum, das seit vielen Jahren bereits in der Behandlung von Patienten mit COPD (chronic obstructive pulmonary disease) eingesetzt wird (Halpin et al., 2016). Nun wird es von der GINA auch für Asthmatiker als inhalative add-on-Therapie in Stufe 4 und 5 empfohlen, wenn die Patienten mehrere Exazerbationen in der Vorgeschichte aufweisen und älter als 12 Jahre sind (GINA 2016).

Target des Medikaments sind muskarinerge Rezeptoren des Parasympathikus, der die Atemwege innerviert. Diverse Stimuli, unter anderem auch inhalative Antigene, führen zur vermehrten Ausschüttung des parasympathischen Neurotransmitters Acetylcholin (Buels et al., 2012). Dieser bewirkt über die Bindung an spezifische muskarinerge Rezeptoren von glatten Muskelzellen eine Bronchokonstriktion (Price et al., 2014) und hat außerdem eine proinflammatorische Wirkung (Halpin et al., 2016). Beides trägt zusammen mit einer bronchialen Hyperreagibilität zur typischen Symptomatik des Asthma bronchiale bei (Buels et al., 2012). Tiotropium ist in der Lage, die muskarinergen Rezeptoren zu blockieren, sodass eine Bindung von Acetylcholin mit konsekutiver Bronchokonstriktion verhindert wird (Buels et al., 2012). Neben dem bronchodilatativen Effekt und der Reduktion akuter Exazerbationen besitzt Tiotropium außerdem ein sehr günstiges Nebenwirkungsprofil, sodass es eine Bereicherung der aktuellen Therapieempfehlungen darstellt (Radovanovic et al., 2017). Dennoch bietet auch diese neue medikamentöse Option keine kausale Therapie des Asthma bronchiale.

1.4.3 Antisense-Strategien

Bis zur Ausbildung des klinischen Vollbildes des chronischen Asthma bronchiale sind alle Zytokin-vermittelten Vorgänge, wie die Differenzierung von Entzündungszellen und strukturelle Veränderungen am Bronchialepithel, bereits erfolgt. Durch eine medikamentöse Blockierung der Zytokine in ihrer Wirkung auf die Zielzellen kann die Entzündungsreaktion zwar weitestgehend kontrolliert werden, die Zytokin-Überexpression hat aber bereits stattgefunden.

Das Konzept der Antisense-Strategien wurde im Jahre 1978 entwickelt und beruht auf dem Ansatz, eine Proteinüberexpression bereits auf Ebene der Gentranskription zu verhindern (Zamecnik und Stephenson, 1978), um so eine kausale Therapieoption für Erkrankungen wie z.B. das Asthma bronchiale zu bieten. Ein erster therapeutischer Erfolg gelang 2006, als durch den Einsatz von Antisense-Molekülen bei mit Ebola infizierten Affen eine Heilung von 75% erreicht wurde (Warfield et al., 2006).

Die mRNA, die durch Transkription der kodierenden DNA im Zellkern entsteht und als sense-Strang bezeichnet wird, ist einzelsträngig. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Translation, die nachfolgend in den Ribosomen im Zytosol stattfindet. Bei Antisense-Molekülen handelt es sich um einzelsträngige RNA- oder DNA-Segmente, die eine zur Ziel-mRNA komplementäre Sequenz aufweisen und in der Lage sind, an die mRNA zu binden und so deren Translation zu verhindern.

1.4.3.1 Small interfering RNA, Antisense-Oligonukleotide und Ribozyme

Es gibt Antisense-Moleküle, die keine eigene katalytische Aktivität besitzen, um die RNA zu degradieren, und solche, die selbst eine katalytische Spaltung bewirken können. Zu ersteren gehören die über RNA-Interferenz agierenden small interfering RNAs (siRNAs). Ihre inhibitorische Wirkung auf die Genexpression wurde erstmals von Andrew Fire und Craig Mello in der Fadenwurmart *Caenorhabditis elegans* beobachtet (Fire et al., 1998). Sie werden durch enzymatische Spaltung aus längerer doppelsträngiger RNA gebildet. Die resultierenden kurzen Nukleotidsequenzen werden in Form eines Komplexes, dem RISC (RNA-induced silencing complex), zur entsprechenden Ziel-mRNA weitergeleitet (Zamore, 2002). Teil des Komplexes ist eine Ribonuklease (s. Abb. 4), welche die eigentliche Spaltung der mRNA bewirkt (Sioud und Iversen, 2005).

Ähnlich wie diese aus RNA generierten Antisense-Moleküle sind auch die aus DNA bestehenden Antisense-Oligonukleotide (ASO) nicht selbst in der Lage, mRNA zu spalten. Die 15-20 Basen langen Sequenzen unterdrücken die Translation durch Hybridisierung an die Ziel-mRNA. Entweder nur durch diesen statischen Effekt oder durch die zusätzliche Aktivierung einer Endonuclease, die RNase H1, kommt es zur Zerstörung oder Destabilisierung der betreffenden mRNA-Struktur (s. Abb. 4), während das eigentliche ASO unverändert bleibt und weiterhin als Inhibitor der Genexpression fungieren kann (Crooke, 2004; Wu et al., 2004).

1. Einleitung

Bisher konnten erst wenige Antisense-Moleküle in der klinischen Praxis eingesetzt werden. So wurde 1998 ein ASO zur Behandlung der durch das Zytomegalievirus verursachten Retinitis eingesetzt. 2004 erschien ein Medikament zur lokalen Therapie der akuten Makuladegeneration. Aktuell werden gerade in der Onkologie siRNA- und ASO-basierte Präparate auf verschiedenen Stufen klinischer Studien getestet. Noch bestehen häufig Probleme in der Bioverfügbarkeit und teilweise hohen Toxizität (Resnier et al., 2013; Dean und Bennett, 2003).

Der siRNA und den ASO stehen zwei Arten von Molekülen gegenüber, die eigene katalytische Aktivität besitzen: die aus RNA bestehenden Ribozyme und die aus DNA generierten DNAzyme. Auf Letztere soll unter 1.4.3.2 näher eingegangen werden.

Ribozyme sind natürlich vorkommende Moleküle, die unter Anwesenheit von Mg^{2+} oder anderen Metallionen als Kofaktor in Spaltungs- und Spleißvorgänge der mRNA eingreifen und so die Inhalte der Exon-Abschnitte beeinflussen (Cochrane und Strobel, 2008). Dabei können sie selbst die mRNA entweder sequenz- oder strukturspezifisch spalten (s. Abb. 4) oder beim Spleißen zusätzlich eine Re-Ligation katalysieren. Andere Ribozyme wiederum spielen eine Rolle bei der tRNA-Prozessierung und greifen auf diese Art in die Proteinbiosynthese ein (Lewin und Hauswirth, 2001).

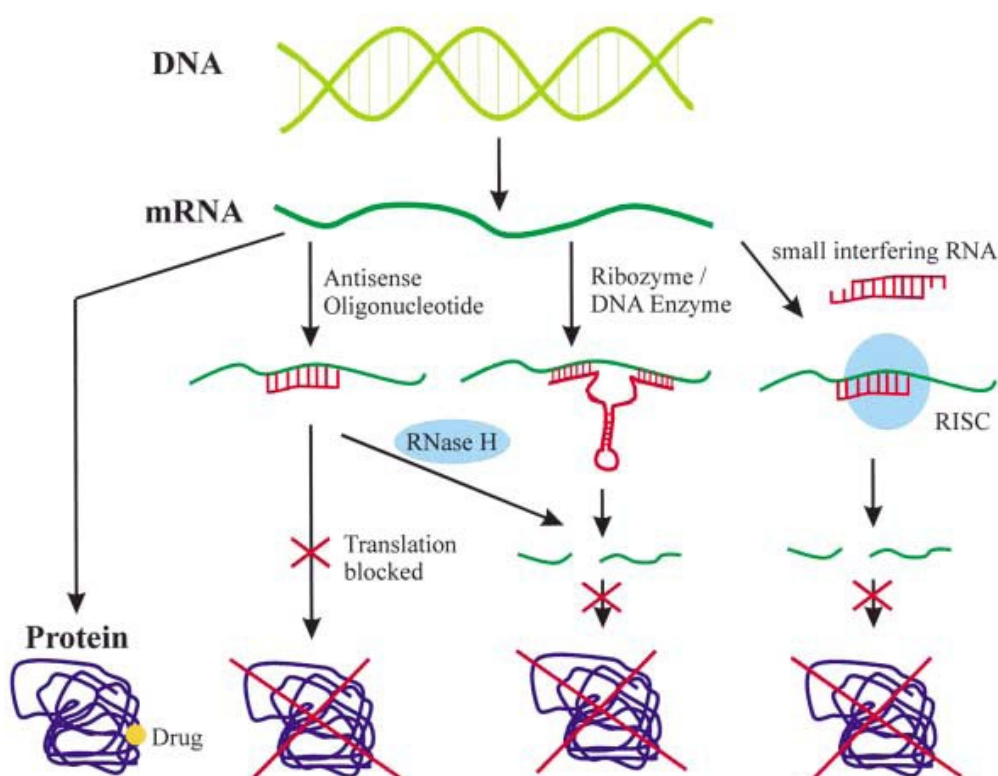


Abb. 4 Wirkmechanismen verschiedener Klassen von Antisense-Molekülen
(entnommen aus Kurreck, 2003)

1.4.3.2 DNAzyme

Analog bestehen DNAzyme aus DNA und besitzen ebenfalls selbst katalytische Aktivität, die sich allerdings als bis zu 15-mal höher im Vergleich zu den Ribozymen erwiesen hat (Kurreck et al., 2002). DNAzyme können unterschiedliche katalytische Eigenschaften aufweisen. Hierzu gehört beispielsweise die enzymatische Spaltung von Peptid- oder DNA-Phosphodiesterbindungen (Chandra et al., 2009). Wiederum andere katalysieren die Ligation von DNA, RNA und Nukleopeptidbindungen sowie Phosphorylierung oder Adenylierung (Lan und Lu, 2012).

Das erste RNA-spaltende DNAzym wurde 1994 von Ronald Breaker in Zusammenarbeit mit Gerald Joyce in Californien generiert. Zur Selektion eines effizienten Moleküls führten sie mehrere Klonierungsexperimente durch. Dazu wurden zunächst DNA-Sequenzen bestehend aus zufälligen Abfolgen von ca. 50 Nukleotiden mit RNA inkubiert, um die katalytische Aktivität anhand der RNA-Degradierung zu untersuchen. Eine weitere Selektion erfolgte aufgrund des Molekulargewichts. Effizient schneidende Klone wurden per PCR amplifiziert (Breaker und Joyce, 1994). Diese Selektions- und Klonierungsabfolge wurde mehrfach durchgeführt, bis man in der 10. Runde mit dem 23. Klon das katalytisch aktivste DNAzym fand. Alle DNAzyme mit dieser Struktur heißen daher 10-23-DNAzyme und zeigen den typischen Aufbau bestehend aus einer zentral gelegenen Sequenz mit der eigentlichen katalytischen Aktivität und beidseits flankierenden Abschnitten aus je 7-10 Nukleotiden, die für die Erkennung ihrer spezifischen Zielsequenz notwendig sind (s. Abb. 5). Die katalytisch wirkende Region ist 15 Nukleotide lang und in der Lage, die Phosphodiesterbindung zwischen Purin und Pyrimidin zu spalten (Lam et al., 2010; Santaro und Joyce, 1997). Sie benötigt dazu allerdings wie auch bei Ribozymen die Anwesenheit von Metallionen wie Mg^{2+} (Baum und Silverman, 2008; Breaker und Joyce, 1995).

Zu der eingangs genannten Aktivitätserhöhung im Vergleich zu Ribozymen kommt es beispielsweise durch den Ersatz des Sauerstoff-Atoms am C₂ durch eine Methylgruppe. Darüber hinaus bewirkt das Anhängen eines inversen Thymidins am 3'-Ende einen höheren Schutz gegenüber Nukleasen und damit eine erheblich verbesserte Stabilität der Moleküle (Schubert et al., 2003). Die beiden Bindungsarme besitzen keine katalytische Aktivität und können daher beliebig verändert werden, ohne einen Einfluss auf die enzymatische Reaktion zu haben. Theoretisch ist es also möglich, je nach Ziel-Sequenz genau passende Bindungsarme zu erstellen und damit auf sehr spezifische Art und Weise mRNA anzugreifen. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten in der Therapie

1. Einleitung

onkologischer, neurologischer und immunologischer Erkrankungen. Im Hinblick auf das allergische Asthma bronchiale hatte der Einsatz eines GATA-3-spezifischen DNAzyms im Mausmodell bereits 2008 Erfolge bezüglich Behandlung und Prävention der akuten sowie chronischen Atemwegsentzündung gezeigt (Sel et al., 2008). Inzwischen liegen die Ergebnisse einer klinischen Studie vor. Krug et al. führten eine randomisierte, doppelblinde, plazebokontrollierte, multizentrische Phase IIa-Studie durch, bei der Asthmatiker mit dem inhalativen DNAzym SB010 behandelt wurden. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion bei guter Verträglichkeit des Präparats (Krug et al., 2015).

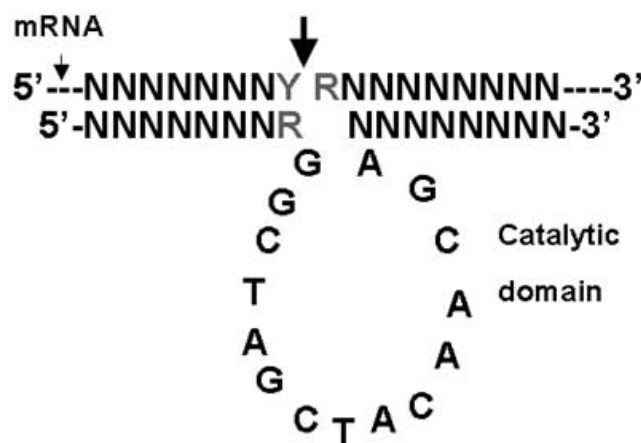


Abb. 5 Generelle Struktur eines „10-23“-DNAzyms (entnommen aus Sioud und Iversen, 2005)

1.4.3.3 Probleme in der Quantifizierung des Effekts von DNAzymen

Wie bereits in den ersten Experimenten von R. Breaker und G. Joyce werden auch heutzutage noch aufwändige *in vitro*-Selektionen durchgeführt, um DNAzyme zu generieren (Breaker und Joyce, 1994). Zu Beginn einer Selektionsrunde werden mehrere zufällige DNA-Sequenzen generiert, die 40-80 Basenpaare lang sind. Um die DNA-Sequenzen später mittels PCR vervielfältigen und untersuchen zu können, werden sie von Primer-spezifischen Regionen flankiert. Der Pool von ca. 10^{15} verschiedenen DNA-Molekülen wird anschließend einem Prozess unterzogen, der es ermöglicht, die wenigen katalytisch aktiven Sequenzen von den nicht-aktiven zu separieren. Hierzu existieren verschiedene Methoden. Häufig wird ein Ende der DNA-Sequenzen über ein Adenosin-Ribonucleotid (rA) mit einem Biotin-Molekül verbunden. Die Abschnitte, welche eine katalytische Aktivität besitzen, sind in der Lage, dieses Molekül unter Einfluss von Metallionen auto-enzymatisch abzuspalten. Anschließend erfolgt die

1. Einleitung

Separierung mit Hilfe einer Streptavidin-Säule. Die noch immer mit dem Biotin-Molekül verbundenen, nicht katalytisch-aktiven Nukleotidsequenzen bleiben in der Säule zurück. Die aktiven DNA-Sequenzen werden anschließend mittels PCR amplifiziert. Da in nur einer Selektionsrunde zum einen nicht genügend DNA-Moleküle für die weitere Analyse gewonnen werden können und zum anderen stets auch einige inaktive Sequenzen einer Separation entgehen, müssen weitere Runden angeschlossen werden. Um katalytisch aktive DNA-Moleküle in ausreichender Quantität generieren zu können, sind normalerweise 5-15 Selektionsrunden notwendig (Baum und Silverman, 2008). Alternativ können die einzelnen Moleküle über PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) voneinander getrennt werden (Lan und Lu, 2012).

Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens zur DNA-Isolation können theoretisch katalytisch aktive Sequenzen generiert und amplifiziert werden. Eine Aussage über die Spezifität und tatsächliche Effektivität der resultierenden DNAzyme ist dabei nicht möglich. Zudem existiert durch die variable Gestaltung der Bindungsarme theoretisch ein immenser Pool möglicher Kombinationen aus DNAzym und passenden Zielstrukturen. Daher müssen weitere *in vitro*-Experimente durchgeführt werden, die mit großem Aufwand entweder die RNA-Degradationsprodukte, die entsprechende cDNA oder auch die resultierenden Proteine untersuchen.

Mehrere Arbeitsgruppen haben eigene, bisher jedoch nicht standardisierte Nachweismethoden entwickelt. Mittels einer Fragmentlängenanalyse beispielsweise können die spezifischen DNAzym-Spaltstellen identifiziert werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Multiplex Cleavage Assays, bei dem die Ziel-RNA mit unterschiedlichen DNAzymen inkubiert werden. Nach reverser Transkription der resultierenden Spaltprodukte können diese über eine Gelelektrophorese und Analyse der Fragmentlängen identifiziert werden (Hostmann, 2008).

In unserer Arbeitsgruppe hat Frau Dr. T. Dicke einen Cleavage-Assay etabliert, durch den die katalytische Aktivität und die Spezifität eines DNAzyms nachgewiesen werden kann. Hierbei wird *in vitro* generierte cDNA mit dem zu untersuchenden DNAzym inkubiert, um die entstehenden Spaltprodukte anschließend mittels Gelelektrophorese auftrennen und somit nachweisen zu können. In einem darauf folgenden Schritt kann eine Densitometrie angeschlossen werden, um eine Konzentrationsabhängigkeit der enzymatischen Wirkung zumindest semiquantitativ zu untersuchen (Dicke, 2009).

Werden Versuche zur Spaltung von RNA in Zelllinien durchgeführt, ist der Aufwand noch höher. Vor der PCR muss zunächst eine reverse Transkription der RNA-Spaltprodukte zur Generierung von cDNA erfolgen. Frau Dr. T. Dicke entwickelte außerdem eine Methode zum Nachweis von Spaltprodukten auf der Basis einer Anionen-Austausch-Chromatographie unter Verwendung einer HPLC. Darüber hinaus existieren *in vivo*-Versuchsansätze. Diese sind allerdings in Anbetracht des großen Pools an DNAzymen nicht praktikabel.

Die geschilderten Nachweissysteme sind alle sehr zeitaufwändig. Insbesondere ist eine quantitative Aussage zum katalytischen Effekt sehr limitiert und an aufwändige, mehrschrittige Versuche geknüpft. Hinzu kommt eine gewisse Instabilität der zu untersuchenden RNA-Spaltprodukte mit Auswirkung auf die Validität der Ergebnisse (s. 5.1). Zum Zeitpunkt der experimentellen Phase der Arbeit existierte noch kein effizientes und standardisierbares System zum Nachweis der Effektivität von DNAzymen *in vitro*.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Antisense-Strategien bieten neue Möglichkeiten zur Behandlung chronischer Erkrankungen. Unter den verschiedenen Antisense-Molekülen stellen DNAzyme eine vielversprechende Option zur kausalen Therapie des Asthma bronchiale dar. Es existiert ein sehr großer Pool von DNAzymen, die eine unterschiedlich hohe katalytische Aktivität aufweisen. Um diese Aktivität *quantitativ* und ohne höheren Zeitaufwand erfassen zu können, bedarf es eines standardisierbaren *in vitro*-Testsystems. Dieses war zum Zeitpunkt der experimentellen Phase dieser Dissertation noch nicht verfügbar. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein einfaches Testverfahren zu entwickeln.

Nachweisverfahren, mit denen mittels Messung von Fluoreszenz und Lumineszenz quantitative Aussagen getroffen werden können, sind weit verbreitet und gut standardisierte Methoden. Entsprechend sollten Vektoren generiert werden, die neben Reportergenen zur Kodierung von fluoreszierenden Proteinen oder Luciferasen die Zielstruktur eines DNAzyms enthalten. Zur Etablierung fiel die Wahl daher auf das GATA-3-spezifische DNAzym hgd40. Dieses DNAzym war in vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe als katalytisch aktiv und anwendbar auf humane GATA-3 mRNA identifiziert worden. Die GATA-3-Sequenz sollte in zwei verschiedene Vektoren kloniert werden, von denen einer für das fluoreszierende Protein mCherry kodiert und der andere eine Sequenz für die Luciferasen Firefly und Renilla enthält. Mit

1. Einleitung

den resultierenden Expressionsvektoren sollten anschließend unterschiedliche Zelllinien transfiziert werden, die dann mit dem DNAzym hgd40 und einem Kontroll-DNAzym ohne katalytische Wirkung in Bezug auf GATA-3 (ODNg) behandelt werden. Eine substratspezifische mRNA-Spaltung durch hgd40 sollte anschließend über eine supprimierte Fluoreszenz bzw. Lumineszenz durch verminderte Proteinexpression gemessen werden. Auf diese Weise kann die DNAzym-Aktivität *in vitro* quantitativ erfasst werden. Sollte es gelingen, ein derartiges Nachweissystem zu etablieren, sollen weitere DNAzyme getestet werden.

Hypothesen:

1. Reportersysteme bieten eine Möglichkeit, einfache und standardisierbare *in vitro* Nachweissysteme zur Analyse der Effizienz von DNAzymen zu entwickeln, die zur Behandlung des allergischen Asthma bronchiale eingesetzt werden sollen.
2. Durch Klonierung können Expressionsvektoren konstruiert werden, die neben einer Sequenz für ein fluoreszierendes Protein bzw. Luciferasen eine Sequenz enthalten, die für den Transkriptionsfaktor GATA-3 kodiert. Der resultierende Expressionsvektor kann mittels Transfektion in Zellen eingebracht werden.
3. Eine Behandlung der den Expressionsvektor enthaltenden Zellen mit einem GATA-3-spezifischen DNAzym führt zur Degradierung der GATA-3 mRNA.
4. Da die GATA-3-Sequenz mit der Sequenz für das fluoreszierende Protein bzw. für die Luciferasen gekoppelt ist, führt eine Degradierung der mRNA zu einer messbaren Suppression des jeweiligen Signals (Fluoreszenz bzw. Lumineszenz). Auf diese Weise lässt sich die Effizienz des DNAzyms *quantitativ* abbilden.

2. Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

HEK-293	ATCC (American type culture collection)
HeLa	ATCC (American type culture collection)

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Chamber Slides für Konfokalmikroskopie	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc, Roskilde, Dänemark
24-Well-Zellkulturplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark
48-Well-Zellkulturplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well-Zellkulturplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark

2.1.3 Zellkulturmedien und –zusätze

Dulbecco's MEM (1x) high Glucose, L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, D
Dulbecco's MEM (1x) high Glucose, L-Glutamin, ohne Phenolrot	Biochrom AG, Berlin, D
Fätales Kälberserum (FCS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

2.1.4 Transfektion

Chloroquine Diphosphate Salt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DharmaFECT Duo	GE Dharmacon, Lafayette/Colorado, USA
DOTAP Transfection Reagent	Roche, Penzberg, D
Escort Transfection Reagent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Genejuice	Merck, Darmstadt, D
Lipofectamine	Invitrogen, Karlsruhe, D
PEG-PEI Transfection Reagent	Zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Olivia Merkel (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Marburg)

2. Material

Tfx TM Transfection Reagent	Promega, Maddison, USA
TransIT-LT1 Transfection Reagent	Mirrus, Madison, USA

2.2 Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, D
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumhydroxidlösung (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypton aus Casein	Roth, Karlsruhe, D
Trypsin/EDTA 0,0025%	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Wasser (RNase-frei)	Qiagen, Hilden, D

2.3 Puffer

Puffer	Bestandteile	Hersteller
CASY® Ton	Fertigpuffer	Schärfe Systems, Reutlingen D
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 12 mM Phosphat ($\text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^-$)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
HBS Puffer	20 mM HEPES 150 mM NaCl	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Reporter Lysis Puffer 5x	Fertigpuffer	Promega, Maddison, USA

2. Material

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	10 mM $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (EDTA) 0,2 M $C_2H_4O_2$ 0,4 M $C_4H_{11}NO_3$ (TRIS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	100 mM TRIZMA Base 90 mM Borsäure 4 mM Na_2 EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D Roth, Karlsruhe, D

2.4 Kits

CellTiter 96 [®] Aqueous One Cell Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Maddison, USA
Desoxyribonuclease I, Amplifikation	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dual-Glo [™] Luciferase Assay System	Promega, Maddison, USA
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D
Omniscript [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
QIA Quick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
Quanti Tect Sybr Green	Qiagen, Hilden, D
Rneasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.5 Klonierung

CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
EcoRV Fast Digest Restriktionsenzym	Fermentas, St. Leon-Rot, D
EcoRV Fast Digest 10x Buffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D
NotI Restriktionsenzym	Fermentas, St. Leon-Rot, D
NotI 10x Buffer O	Fermentas, St. Leon-Rot, D
S.O.C Medium für TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
T4 10x Ligation Buffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.6 Plasmide

GFP-GATA-3-Vektor	Zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Tanja Dicke (Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik, Marburg)
V.302creIREScherry- Vektor	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Sparwasser (Institut für Infektionsimmunologie, Hannover)
pCR [®] 2.1 TOPO [®] -Vektor	TOPO TA Cloning [®] Kit, Invitrogen s. Kits
psiCheck TM 2-Vektor	Promega, Maddison, USA

2.7 Primer

Cherry sense se	5'-GGC CTT GTA GGT GGT CTT GA-3'
Cherry antisense as	5'-CCC CGT AAT GCA GAA GAA GA-3'
GAPDH se	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3'
GAPDH as	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'
huGATA-3 se	5'-CTC AGC CAC TCC TAC ATG GAC-3'
huGATA-3 as	5'-GTA GTG TCC CGT GCC ATC TC-3'
huGATA-3-EcoRV se	5'-GAT ATC AGG ACA TGG AGG TGA CTG CG-3'
huGATA-3-EcoRV as	5'-GAT ATC TGT GGC TGG AGT GGC TGA AG-3'
huGATA-3-NotI se	5'-GCG GCC GCA CTC AGC CAC TCC TAC ATG GAC-3'
huGATA-3-NotI as	5'-GCG GCC GCA GTA GTG TCC CGT GCC ATC TC-3'

Alle synthetisiert durch Metabion, Martinsried, D

Oligo-Dt ₁₈ - Primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT
---------------------------------	---------------------

Synthetisiert durch MWG-Biotech, Ebersberg, D

2.8 DNzyme

DNAzym hgd40 5'-GTGGATGGAGGCTAGCTACAACGAGTCTTGGAG[Dt-rev-Q]	Biospring, Frankfurt, D
DNAzym hgd40 FAM-markiert 5'-[6-FAM]GTGGATGGAGGCTAGCTACAACGAGTCTTGGAG [Dt-rev-Q]	Biospring, Frankfurt, D
Kontroll-DNAzym ODNg 5'-TGTGATGTAGGCTAGCTACAACGACAGATGGAA[Dt-rev-Q]	Operon, Köln, D

[Dt-rev-Q] = inverses Thymin am 3'-Ende

[6-FAM] = 6-Carboxyfluorescein am 5'-Ende

2.9 Marker und Ladepuffer

Gel-Loading-Solution Typ I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.10 Verbrauchsmaterialien

Costar 96-well-Platte, black, clear	Corning Incorporated USA
Costar 96-well- Platte, white, clear	Corning Incorporated, USA
Deckglas	Menzel GmbH, Braunschweig, D
ep T.I.P.S Standard	Eppendorf AG, Hamburg, D
FACS - Röhrchen	BD, Heidelberg, D
Kanüle (20 G)	BD, Heidelberg, D
Nagellack	UMA Cosmetics, Wiesbaden, D
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reaktionsgefäße 15 ml	BD, Heidelberg, D
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner bio-one, Solingen, D
0,1 ml Strip-Tubes	Corbett, Sydney, AUS

2.11 Geräte

Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Brutschrank	Heraeus, Osterode, D
CASY® Model TT (Cell-Counter, Analyser System)	Schärfe Systems, Reutlingen, D
CLSM Axiovert 100 M	Zeiss, Oberkochen, D
CLSM 510 Scanning Device	Zeiss, Oberkochen, D
Elektrophorese System	Peqlab, Erlangen, D
FACScan	BD, Heidelberg, D
Fluoreszenzmikroskop F-View	Olympus; Hamburg, D
Fluorometer POLARstar	BMG, Offenburg, D
Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gel Doc 2000	Bio Rad, München, D
Luminometer LUMIstar	BMG, Offenburg, D
Mikrotiterplattenreader Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Pipetten	Eppendorf AG; Hamburg, D
Rotorgene 3000	Corbett; Sydney, AUS

2. Material

Schüttelinkubator GFL 3031	GFL, Burgwedel, D
Ultraspec 3100pro UV/Visibel	Biochrom, Cambrigde, UK
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D

2.12 Software

CellQuestPro	BD, Heidelberg, D
GraphPad Prism [®] Software	San Diego, USA
LSM Image Browser	Zeiss, Oberkochen, D
Photometersoftware Magellan	Tecan, Crailsheim, D
RotorGene [™] 3000 Software	Corbett, Sydney, AUS

3. Methoden

3.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.1.1 Aufreinigung von cDNA aus Agarosegel

Zur Aufreinigung von DNA-Sequenzen wurde der Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden drei Volumen Puffer QG zu einem Volumen des Gelstücks gegeben und 10 min bei 50°C inkubiert, bis sich das Gelstück komplett aufgelöst hatte. Nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol wurde die Probe auf eine Säule geladen und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl QG Puffer und 750 µl PE Puffer gewaschen. Zum Trocknen wurde nochmals zentrifugiert bevor die aufgereinigte DNA schließlich mit 30 µl sterilem Wasser eluiert werden konnte. Die Reinheits- und Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

3.1.2 Aufreinigung von Plasmiden aus Bakterienkulturen

Je nach Menge des aufzureinigenden Plasmids wurden verschiedene Kits verwendet. Für kleinere Mengen bis 20 µg war der QIAprep Spin Miniprep Kit ausreichend, bei dem nach Bakterienlyse ein Säulensystem verwendet wird, durch das die Plasmid-DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silical-Gel-Membran gebunden und schließlich mit sterilem Wasser eluiert wird.

Gemäß Herstellerangaben wurde die Bakterienkultur zunächst 15 Minuten bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem das Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und die Suspension mit 250 µl Puffer P2 und 350 µl Puffer N3 versetzt worden war, musste erneut 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert werden. Die QIAprep Spin Säulen wurden anschließend mit den Überständen beladen und eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zum Entfernen noch vorhandener Pufferreste wurde die leere Säule noch einmal bei 20.000 rpm zentrifugiert. Schließlich erfolgte die Elution des aufgereinigten Plasmids mit 30 µl sterilem Wasser.

Größere Mengen Plasmid bis 500 µg wurden mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Maxi Kits aufgereinigt. Hierbei wurde das durch Zentrifugation der Bakterienkultur (15 min, 4000 rpm, 4°C) erzeugte Bakterienpellet gemäß Herstellerangaben zunächst in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von Puffer P2 und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte durch Mischen mit 10 ml Puffer P3 die Fällung der

Proteinbestandteile bewirkt werden. Die so entstandene Suspension wurde nun in die QIAfilter Maxi Cartridge überführt und darin 10 min inkubiert, sodass sich die ausgefällten Bestandteile oberhalb der flüssigen Phase des Lysats absetzen konnten. Nach Äquilibration der HiSpeedMaxi Tip Säule mit 10 ml QBT Puffer wurde die flüssige Phase des Lysats mit einem Spritzenstempel hinein gepresst und die Plasmid-DNA dabei an die Säulenmembran gebunden. Bevor die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert werden konnte, wurde die Säule mit 60 ml QC-Puffer gewaschen. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und anschließender fünfminütiger Inkubation. Das DNA/Isopropanol-Gemisch wurde danach in eine 30 ml-Spritze überführt und zur Filterung durch das QiaprecipitatorMaxiModule gedrückt. Vor Elution der DNA mit 0,5 ml sterilem Wasser wurden erst 2 ml 70%iges Ethanol und dann zum Trocknen mehrmals Luft durch den Präzipitator gepresst. Eine größere Menge an aufgereinigtem Plasmid konnte erhalten werden, indem das Eluat ein zweites Mal durch den Präzipitator gepresst wurde.

Die DNA-Konzentration und -Reinheit wurden jeweils photometrisch bestimmt.

3.1.3 Aufreinigung von linearisierten Plasmiden nach Restriktionsverdau

Mithilfe des PCR-Purification Kits konnten durch Restriktionsverdau linearisierte Plasmide (s. 3.3.2) aufgereinigt werden. Dazu wurde der Verdau mit 200 µl PB-Puffer versetzt und das gesamte Volumen auf eine QIAquick-Säule gegeben. Nach Zentrifugation von 1 min und Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte schließlich mit 60 µl sterilem Wasser nach zweimaliger Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses.

3.1.4 Aufreinigung von RNA

Die Isolation der RNA aus behandelten Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von Qiagen nach Ernte der Zellen (s. 3.4.1) und Aufnahme in 350 µl RLT/ β -Mercaptoethanol-Puffer und Homogenisierung der Probe durch mehrfache Aspiration mit einer 1 ml-Spritze mit dünnlumiger Nadel. Die Probe wurde dann mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt, auf eine RNeasy Spin Säule gegeben und 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation von 15 Sekunden bei 10.000 rpm. Zum Waschen der Probe war eine Zentrifugation von zunächst 15 Sekunden bei 10.000 rpm und dann von 2 min bei 13.000 rpm, jeweils nach Zugabe von 500 µl RPE-

Puffer, notwendig. Anschließend musste die Säule noch einmal leer 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert werden, bevor die RNA durch Zugabe von 30 µl sterilem Wasser und Zentrifugation von 1 min bei 13.000 rpm eluiert werden konnte.

3.1.5 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und DNA wurde photometrisch bestimmt. Gleichzeitig konnte über eine Messung der optischen Dichte in Vergleich zu reinem Wasser eine Berechnung der Reinheit erfolgen. Zunächst musste die Probe mit Wasser verdünnt und in eine Mikroküvette gegeben werden. Dann wurde die optische Dichte bei 260nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) gemessen. Bezogen auf den Referenzwert Wasser ist das Messgerät (Ultraspec 3100pro UV/Visibel) anschließend in der Lage, die Konzentration der Nukleinsäure zu berechnen. Mittels Quotientenbildung aus OD_{260} und OD_{280} lässt sich schließlich eine Aussage zur Reinheit treffen. Diese ist optimal, wenn der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

3.2 Synthese, Amplifikation und Nachweis von DNA-Sequenzen

3.2.1 Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA aus RNA (s. 3.1.4) war zunächst ein Verdau von noch vorhandener DNA notwendig, der mittels DNaseI-Kit von Qiagen durchgeführt wurde. Dazu wurden gemäß Herstellerangaben eine RNA-Menge von 0,5 µg in maximal 4 µl sterilem Wasser verwendet, zu der 1 µl DNaseI, 1 µl DNase 10x Puffer sowie 4 µl steriles Wasser hinzugefügt wurden. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils 1 µl EDTA hinzu gegeben. Schließlich musste die Probe 10 min bei 65°C inkubiert und dann sofort auf Eis gelagert werden. Für die anschließende reverse Transkription zur cDNA-Synthese wurde der Omniscript Kit von Qiagen genutzt. Dabei wurden 2 µl RT-Puffer, 2 µl dNTPs, 1 µl OligodT18, 1 µl Reverse Transkriptase (ORT) und 3 µl steriles Wasser zu der RNA gegeben. Es folgte die reverse Transkription im Thermocycler (1 Stunde bei 37°C, 5 min bei 93°C) und Lagerung der cDNA bei -20°C.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Sequenzen zu generieren und amplifizieren, aber auch um die Expression von Nukleinsäuren nachweisen zu können, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Wird diese zur RNA-Quantifizierung eingesetzt, wird

sie aufgrund des vorangehenden Schrittes der reversen Transkription auch als Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) bezeichnet.

Die PCR erfolgte mit Hilfe des HotStarTaq Master Mix Kits von Qiagen. Das Protokoll sieht die Zugabe von 1 µl cDNA oder Plasmid-DNA ($1:10^5$ mit Wasser verdünnt) zu 25 µl Taq Master Mix, 1 µl Primer sense, 1 µl Primer antisense und 22 µl Wasser vor. Die PCR erfolgte im Thermocycler unter den in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen.

Tabelle 3 PCR-Bedingungen

1. Initial Activation Step	15 min	95°C
2. Denaturierung	1 min	94°C
3. Annealing	40 s	58°C
4. Extension	2 min	72°C
5. Final Extension	10 min	72°C
Zyklenzahl	Schritt 2-4	35 Zyklen

Auf diese Weise wurde aus cDNA von Jurkat-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Tanja Dicke) mittels GATA-3-Primern ein entsprechendes Produkt amplifiziert, dem unter denselben PCR-Bedingungen mit den Primern GATA-3-EcoRV- bzw. GATA-3-NotI-Schnittstellen endständig zur Einklonierung in den jeweiligen Vektor angefügt werden konnten. Analog wurde zum Nachweis der RNA-Expression eine PCR der cDNA mit Primern für GAPDH, Cherry und GATA-3 durchgeführt. Anschließend konnte die DNA mittels eines 1,3%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dem Agarosegel wird 1 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Während der Elektrophorese interkaliert die Substanz zwischen den Basen der Nukleinsäuren, wodurch ihre Anregungsfähigkeit unter UV-Licht stark erhöht wird. Somit können die aufgetrennten Nukleinsäuren per UV-Kamera sichtbar gemacht, ausgeschnitten und aufgereinigt werden.

3.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mit der klassischen RT-PCR ist lediglich ein qualitativer Nachweis der Nukleinsäure-Expression möglich. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, ist eine Real-time-qPCR vorteilhaft. Dabei wird in jedem Zyklus der PCR ein bestimmter Anteil eines fluoreszierenden Farbstoffs (z.B. SybrGreen) in die entstehende cDNA eingebaut, der dann vom Gerät direkt detektiert werden kann. Proben mit hohem spezifischem DNA-Anteil weisen dabei eine geringere Zyklenzahl bis zum Erreichen einer

nachweisbaren Fluoreszenz auf als solche mit geringerem Anteil. Die Auswertung erfolgt durch Quotientenbildung aus den Werten für das untersuchte Gen und denen für ein entsprechendes Housekeeping-Gen, wie beispielsweise GAPDH. Zur Analyse der Reinheit und Pipettiergenauigkeit dient dabei die Schmelzkurve, die durch nachfolgende Denaturierung der DNA erstellt wird. Analog zur RT-PCR wird sie mit Bezug auf die reverse Transkription auch als quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) bezeichnet. Bei der Durchführung der qPCR wurden zu je 1 µl cDNA 5 µl SybrGreen, je 0,25 µl Primer sense und antisense und 3,5 µl steriles Wasser hinzugefügt. Die qPCR erfolgte im Rotorgene bei einer Annealing-Temperatur von 60°C und mit 35 Zyklen.

3.3 Klonierung zur Konstruktion von Expressionsvektoren

Den zu erstellenden Testsystemen für die Effizienz von DNAsymen liegt die Expression fluoreszierender oder Lumineszenz erzeugender Proteine zugrunde. Dabei muss ein entsprechender Vektor generiert werden, der sowohl den für diese Proteine kodierenden Abschnitt als auch die Angriffssequenz für das DNAsym enthält. Dieser kann anschließend in geeignete Zelllinien eingebracht und die Expression der Proteine analysiert werden. Für das mit Fluoreszenz arbeitende Testsystem wurde der Vektor V.302creIREScherry (vereinfacht „mCherry-Vektor“) verwendet, der freundlicherweise von Prof. Dr. T. Sparwasser (Hannover) zur Verfügung gestellt wurde (s. Abb. 6). Für die Lumineszenz fiel die Wahl auf den Vektor psiCheckTM2 (vereinfacht „psiCheck-Vektor“) der Firma Promega (s. Abb. 7). Als Angriffssequenz für das zu testende DNAsym sollte der für den Transkriptionsfaktor GATA-3 kodierende Abschnitt dienen.

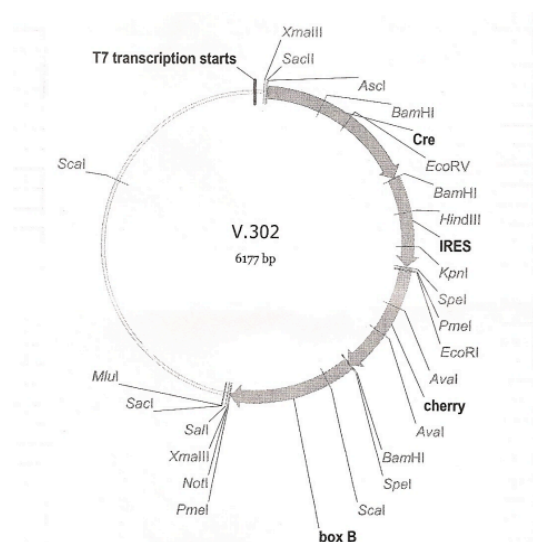


Abb. 6 Vektorkarte für V.302creIREScherry

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Sparwasser, Hannover)

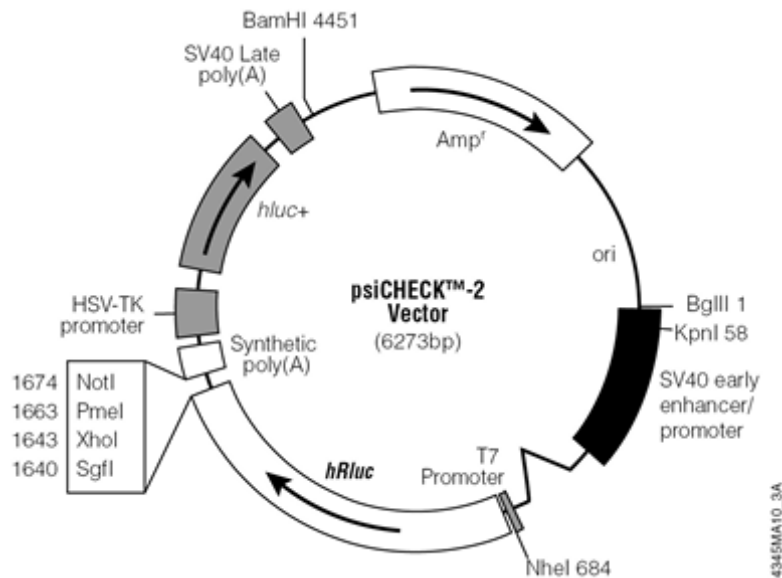


Abb. 7 Vektorkarte für psiCheck™2 (Promega, Maddison, USA)

3.3.1 Herstellung von Nährmedium und Nährboden für die Bakterienkultivierung

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden in 950 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und durch Zugabe von Wasser wurde das Medium auf ein Gesamtvolumen von einem Liter aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurde bei einer Temperatur von circa 55°C steriles Ampicillin zugegeben, so dass die Endkonzentration des Antibiotikums im LB-Medium 100 µg/ml betrug.

Für die Herstellung von entsprechenden Agarplatten wurden die Bestandteile des LB-Mediums wie oben beschrieben gemischt und zusätzlich 15 g Agar-Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren und der Zugabe von Ampicillin wurde das noch flüssige Medium in sterile Petrischalen gegossen. Die ausgehärteten Agarplatten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.3.2 Restriktionsverdau

Zur Einklonierung von DNA-Sequenzen in das Plasmid und um deren Erfolg später zu kontrollieren, musste ein Restriktionsverdau durchgeführt werden. Der mCherry-Vektor weist eine passende Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRV, der psiCheck-Vektor hingegen für NotI auf. Dementsprechend wurden 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym, 2 µl 10x des dazugehörigen Puffers und steriles Wasser (auf 20 µl Gesamtvolumen) je 1 µg Plasmid zugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis konnte das verdaute Plasmid aufgereinigt (s. 3.1.3) und zur Ligation (s. 3.3.3)

verwendet werden oder zur Erfolgskontrolle der Klonierung per Gelelektrophorese auf entsprechende Banden hin untersucht werden.

Um bei Entstehung von blunt-ends eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, wurde nach dem Restriktionsverdau eine Dephosphorylierung am 5'-Ende durchgeführt. Dies geschah durch Zugabe von 50 µl Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) und anschließender 30-minütiger Inkubation bei 37°C. Die CIAP wurde durch Erhitzen auf 85°C für 15 min im Heizblock inaktiviert.

3.3.3 Ligation

Die Ligation des linearisierten Plasmids mit dem PCR-Produkt erfolgte durch die T4-Ligase. Hierbei wurde das Plasmid in den Verhältnissen 1:1, 1:2 und 1:3 mit dem aus der TA-Klonierung (s. 3.3.6) aufgereinigten Insert gemischt, jeweils 1 µl T4-Ligase und 2 µl 10x Puffer T4, sowie 2 µl PEG und steriles Wasser (auf 20 µl aufgefüllt) zugefügt und jeder der 3 Ligationsansätze für 24 h bei 4°C inkubiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Ligation bei 65°C (10 min) inaktiviert.

3.3.4 Transformation

Die Transformation wurde mittels One Shot TOPO 10 Chemically Competent E.coli[®] gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des zirkulären Plasmids zu den Bakterien gegeben und der resultierende Transformationsansatz 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Transformation selbst konnte danach durch einen Hitzeschock (exakt 30 Sekunden bei 42°C) erreicht werden. Nach anschließender Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium und 1 Stunde Inkubation auf dem Schüttelinkubator bei 37°C wurden 50 bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.3.5 Amplifikation von Plasmiden aus Bakterienkulturen

Nach Inkubation der transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten wurden am Folgetag pro Platte 10 Klone mit einer Pipettenspitze gepickt und in je 3 ml LB-Medium bei 37°C für 12-16 Stunden auf dem Schüttelinkubator zur weiteren Plasmidanreicherung kultiviert. Von den entstehenden Bakterienkulturen wurden zudem je 850 µl abgenommen, mit 150 µl Glycerol gemischt und als Glycerol-Stocks bei -80°C gelagert. Um eine größere Menge ausgewählter Plasmide zu erhalten, konnten später 5 ml LB-Medium mit 10 µl des Glycerol-Stocks versetzt und für 8 Stunden bei 37°C auf

dem Schüttler kultiviert werden. 800 µl dieser Vorkultur wurden anschließend in 500 ml LB-Medium ebenfalls bei 37°C inkubiert um nach 12-16 Stunden gemäß 3.1.2 aufgereinigt zu werden.

3.3.6 Prinzip der TA-Klonierung

Bei der Verwendung eines PCR-Produkts kann es durch einzelne überhängende Basen an den Enden des Inserts zu Problemen bei der Einklonierung in den gewünschten Vektor kommen. Um dies zu vermeiden, besteht die Möglichkeit, das PCR-Produkt zunächst mithilfe des TOPO TA Cloning Kits[®] von Invitrogen in den linearisierten pCR2.1-Vektor[®] einzuklonieren um es im Anschluss mit dem jeweils passenden Restriktionsenzym an den exakten Enden heraus zu schneiden (s. Abb. 8).

Das TOPO TA Cloning Kit[®] basiert auf der Eigenschaft der Taq-Polymerase, bei der DNA-Synthese einen unspezifischen Überhang von einer Base (in den meisten Fällen Adenosin) an das PCR-Produkt anzuhängen. Damit sich PCR-Produkte der Taq-Polymerase ohne Schwierigkeiten einklonieren lassen, wurde demnach ein Vektor mit Thymidin-Überhang verwendet.

Im Folgenden wird diese, als TA-Klonierung bezeichnete Methode näher erläutert. In einem Strang des doppelsträngigen TOPO-Plasmidvektors (pCR2.1-Vektor[®]) wurde mit Hilfe der Topoisomerase I des Vaccinia Virus spezifisch hinter der Sequenz 5'-CCCTT eine Spaltung des Phosphodiester-Gerüsts erzeugt. Die Schnittstelle findet sich im TOPO-Vektor zweimal in enger Nachbarschaft. Das Enzym bleibt dabei über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung an beide Schnittstellen kovalent gebunden. Diese Bindung kann durch das 5'-Hydroxyl-Ende eines PCR-Produktes angegriffen werden. Hierdurch kommt es zur Freisetzung der Topoisomerase und Ligation des PCR-Produkts. Dabei entsteht ein ringförmiger Plasmid-Vektor. Dazu wurden gemäß dem Protokoll der TA-Klonierung 1 µl pCR2.1-Vektor[®] mit 1 µl Salt Solution, 1 µl 10x Puffer, 1 µl aufgereinigtem PCR-Produkt und 6 µl sterilem Wasser gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten Transformation, Amplifikation (s. 3.3.4 und 3.3.5) und Aufreinigung des Plasmids (s. 3.1.2). Nach Restriktionsverdau (s. 3.3.2) und Aufreinigung aus einem Gel (s. 3.1.1) konnte das Insert zur Ligation (s. 3.3.3) verwendet werden.

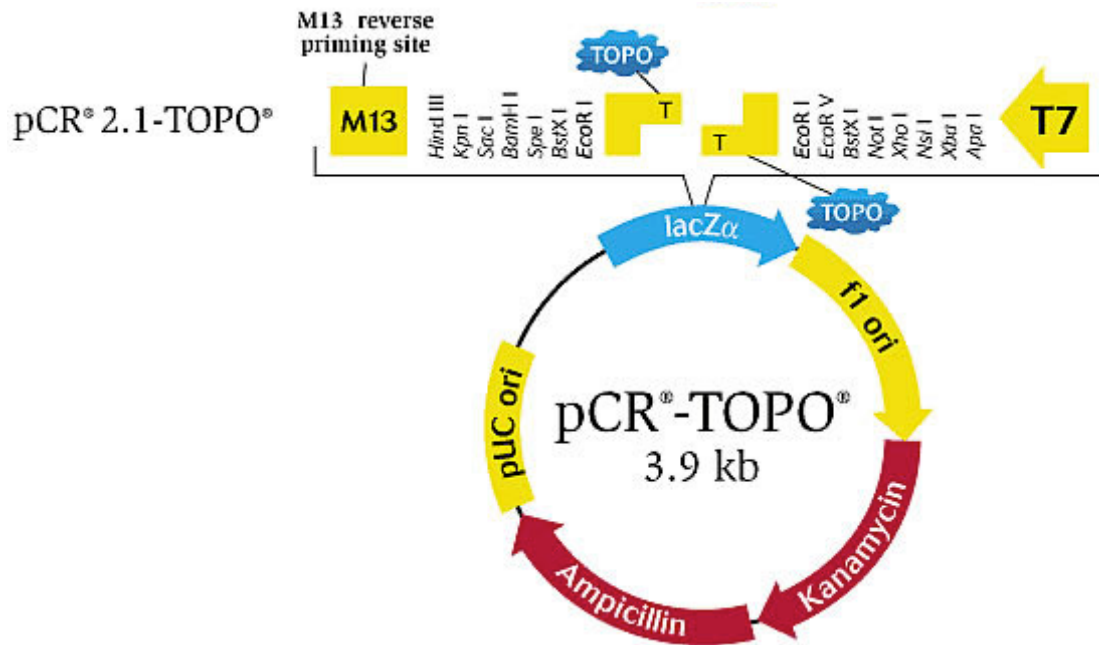


Abb. 8 Aufbau des Plasmidvektors pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, D)

3.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma AGOWA (Berlin, D) durchgeführt. Zur Überprüfung der Übereinstimmung der klonierten Sequenzen mit der Zielsequenz wurde anschließend die Datenbank NCBI BLAST verwendet.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zelllinien

In diversen Vorversuchen wurden unterschiedliche Zelllinien (A 549, COS-7, HEK-293, HeLa) ausgetestet und im Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten, die Transfektionseffizienz und die Eignung für die spätere Messung von Fluoreszenz und Lumineszenz überprüft. Die Humane Nierenepithelzelllinie HEK-293 erwies sich dabei als die geeignetste. Ähnlich effizient ließen sich auch HeLa-Zellen transfizieren, da HEK-293-Zellen im Umgang jedoch leichter zu handhaben sind, entschied man sich für diese Zelllinie.

Die humane Nierenepithelzelllinie HEK-293 (Human Embryonic Kidney) entstand in den siebziger Jahren aus menschlichen embryonalen Nierenepithelzellen durch Transformation mit DNA des menschlichen Adenovirus 5 (Graham et al., 1977). Für die Kultur dieser Zelllinie wurde DMEM high glucose-Medium mit stabilem Glutamin der Firma Biochrom mit folgenden Zusätzen verwendet: 10% inaktiviertes FCS Gold und

1% Penicillin/Streptomycin. Für die Transfektion mit dem mCherry-Vektor war die Verwendung von phenolrotfreiem Medium notwendig.

Zur Subkultivierung wurden die konfluenten Zellen einmal mit PBS gespült. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA 0,0025%. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die abgelösten Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und bei 400 g 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium resuspendiert und ein Zehntel der Zellsuspension wurde in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen im Zellkulturbrutschrank (37°C, 5% CO₂) etwa 24 h inkubiert.

Die Ernte der Zellen zur RNA-Isolation erfolgte nach einmaligem Waschen mit 100 µl PBS durch Zugabe von 100 µl Trypsin/EDTA pro well und anschließender fünfminütiger Inkubation im Brutschrank. Die Reaktion wurde mit 100 µl Zellmedium abgestoppt und das Gesamtvolumen von 200 µl in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 4000 g 5 min zentrifugiert.

3.4.2 Zellzählung

Um eine optimale Dichte für die Transfektion zu erreichen, wurden die Zellen für alle nachfolgend beschriebenen Versuche je nach vorheriger Wachstumsdichte in den Kulturflaschen in einer Konzentration von 3×10^5 oder 4×10^5 Zellen/ml ausgesät.

Dazu musste zunächst eine Zellzählung mit einem Cell-Counter (CASY[®]) durchgeführt werden. Hierfür wurde die Zellsuspension in speziellen CASY[®] Röhrchen in einer gerätespezifischen Elektrolytlösung (CASY[®] Ton) verdünnt. Die Messparameter und die Verdünnung der Zellsuspension wurden dem jeweiligen Zelltyp entsprechend eingestellt.

Die Zellzählung mittels CASY[®] beruht auf folgendem Prinzip: während der Messung wird über der Messkapillare ein Spannungsfeld erzeugt, wobei die elektrolytgefüllte Kapillare einen definierten elektrischen Widerstand darstellt. Sobald die Zellen der zu messenden Probe in die Messkapillare gesaugt werden, verdrängen sie dort eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung, wodurch es zu einer Erhöhung des Widerstands über der Kapillarstrecke kommt. Diese Widerstandsänderung verhält sich proportional zum Volumen der Zellen. Hieraus kann die Gesamtzellzahl berechnet werden, da die durchschnittlichen Volumina der verschiedenen Zelltypen bekannt sind.

3.4.3 Transfektion

3.4.3.1 Transfektion von Expressionsvektoren

Die Expression eines zellfremden Proteins kann durch Transfektion eines kodierenden Plasmids in die entsprechende Zelle erreicht werden. Dabei gibt es sowohl die Möglichkeit der hier angewandten transienten wie einer stabilen, also dauerhaften Transfektion. Zur Optimierung des Verfahrens wurden in Vorversuchen unterschiedliche Transfektionsreagenzien (s. 5.2.2, Tabelle 6) ausgetestet. Da Transfektionsreagenzien wie Genejuice, Lipofectamine, DOTAP und Dharmafect aufgrund der in Tabelle 6 dargestellten Nachteile ausgeschlossen wurden, wird an dieser Stelle nicht näher auf die entsprechenden Transfektionsprotokolle eingegangen. Die Protokolle zu PEI und Tfx sollen nachfolgend beschrieben werden, da diese Transfektionsreagenzien bei mehreren Versuchen erfolgreich eingesetzt wurden, wenngleich auch die Wahl schließlich auf das lipophile Transfektionsreagenz LT1 fiel. Grund hierfür war die hohe Transfektionseffizienz sowie geringe Toxizität. Die Zellen wurden jeweils 24 Stunden vor Transfektion auf den entsprechenden Trägern ausgesät. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Neben den später mit DNazym transfizierten Ansätzen wurden stets eine Positivkontrolle durch alleinige Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid, sowie Negativkontrollen (nur Zellmedium und Zellmedium mit Transfektionsreagenz) angesetzt.

Zur Transfektion mit PEI wurden 0,78 µg PEI für 1 µg DNA verwendet. Der Transfektionsansatz wurde in serumfreiem Nährmedium hergestellt und dann ohne vorherigen Wechsel des Nährmediums zu den Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C bis zur nächsten Behandlung. Da PEI relativ zytotoxisch ist, musste das Nährmedium 5-6 Stunden nach Transfektion gewechselt werden.

Für Tfx wurde gemäß Herstellerangaben ein Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA von 3:1 gewählt. Das bedeutet einen Einsatz von 4,5 µl Tfx (Konzentration nach Herstellerangaben 1 mM) pro µg DNA. Nach Mischen von Tfx, DNA und einer entsprechenden Menge serumfreien Nährmediums (je nach Plattengröße, 29 µl/well bei einer 96-well-Platte, 160 µl/well bei einer 24-well-Platte) wurde der Transfektionsansatz bei Raumtemperatur 10-15 min inkubiert. Anschließend wurde das Nährmedium von den am Vortag ausgesäten Zellen entfernt, um den Transfektionskomplex auf die Zellen zu geben und diese anschließend 1 Stunde bei 37°C zu inkubieren. Dann wurden die Zellen mit Vollmedium überschichtet, ohne vorher den Transfektionskomplex zu entfernen (z.B. Auffüllen auf 100 µl/well bei einer

3. Methoden

96-well-Platte oder auf 500 µl/well bei einer 24-well-Platte). Es wurde eine anschließende Inkubation von 48 Stunden bei 37°C durchgeführt, wobei nach 24 Stunden ein Mediumwechsel erfolgte.

Das letztlich für die Vektortransfektion verwendete Transfektionsreagenz LT1 wurde zunächst mit FCS-freiem Zellmedium verdünnt und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das zu transfizierende Plasmid hinzugegeben und für weitere 20-25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnungsverhältnisse gemäß Herstellerangaben lassen sich aus nachfolgender Tabelle ablesen (s. Tabelle 4).

Tabelle 4 Transfektion mit LT1 (modifiziert nach Mirrus, Maddison, USA)

Trägermedium	96-well-Platte	48-well-Platte	24-well-Platte	Chamber Slides
FCS-freies Medium	9 µl	26 µl	50 µl	60 µl
LT1 Reagent	0,28 µl	0,79 µl	1,5 µl	8 µl
DNA (1µg/µl)	0,1 µl	0,26 µl	0,5 µl	4 µl
Kompletter Ansatz	92 µl	263 µl	500 µl	1000 µl

Die Zellen waren 24 Stunden zuvor auf einem je nach geplantem Versuch entsprechendem Träger ausgesät und bei 37°C inkubiert worden. Vor der Transfektion musste das alte Zellmedium entfernt und frisches Medium entsprechend oben angegebener Mengen vorgelegt werden. Dann konnte der Transfektionsansatz hinzugegeben werden. Die Zellen wurden daraufhin im Brutschrank mindestens 12 Stunden, bis zur erneuten Transfektion oder Messung inkubiert.

3.4.3.2 Transfektion von DNazym

Die HEK-293-Zellen wurden dementsprechend nach Transfektion mit dem Plasmid mit dem DNazym hgd40 transfiziert, um dessen Auswirkungen über Messung der Fluoreszenz bzw. Lumineszenz zu bestimmen. Die erste Transfektion mit hgd40 erfolgte entweder 12 oder 48 Stunden nach der Transfektion des Plasmids um zu verschiedenen Zeitpunkten in die Kinetik der Proteinexpression eingreifen zu können. Um eine sichere Aufnahme des DNazyms in die Zellen zu gewährleisten, wurde eine doppelte Transfektion mit einem Zeitabstand von 12 h zwischen beiden Transfektionen vorgenommen. Als Negativkontrolle diente das Kontroll-DNazym ODNg, das eine katalytische Domäne, aber keine spezifischen Bindungssequenzen für GATA-3 mRNA besitzt.

3. Methoden

Es wurden verschiedene Protokolle ausgetestet, unter denen die Entscheidung schließlich auf einen Transfektionsansatz fiel, der mit dem lipophilen Transfektionsreagenz Escort sowie Chloroquine arbeitet. Zunächst wurde das Transfektionsreagenz Escort gemäß Herstellerangaben in HBS-Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) verdünnt und mit dem zu transfizierenden DNAzym hgd40 für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Chloroquine mit FCS-freiem Medium so verdünnt, dass die Endkonzentration 200 mM betrug und hinzugefügt. Der Transfektionsansatz wurde nun auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Da je nach Versuch unterschiedliche Trägermedien verwendet wurden, sind die Mengenangaben für die Transfektion nachfolgend dargestellt (s. Tabelle 5).

Tabelle 5 Transfektion mit Escort/Chloroquine (modifiziert nach Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)

Trägermedium	96-well-Platte	48-well-Platte	24-well-Platte	Chamber-Slides
HBS-Puffer	100 µl	200 µl	400 µl	400 µl
Escort Reagent	0,75 µl	1,5 µl	3 µl	6 µl
DNA (1 µg/µl)	0,5 µl	1 µl	2 µl	4 µl
Chloroquine (200 mM)	100 µl	200 µl	400 µl	800 µl
Kompletter Ansatz	200 µl	400 µl	800 µl	1600 µl

Nach 3-4 Stunden musste der Transfektionskomplex entfernt und durch frisches, FCS-Zellmedium ersetzt werden. Darauf folgte eine weitere Inkubation im Brutschrank bis zur Messung oder weiteren Behandlung der Zellen.

3.4.4 Vitalitätsmessung nach Transfektion

Transfektionsreagenzien können toxisch auf Zellen wirken, gerade bei wiederholter Transfektion. Zur Überprüfung der Zellvitalität nach Transfektion wurde der CellTiter 96[®] Aqueous One Cell Solution Cell Proliferation Assay der Firma Promega verwendet. Es handelt sich dabei um ein colorimetrisches Nachweisverfahren, bei dem aus einem nicht-farbigem Substrat durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen das farbige wasserlösliche Produkt Formazan gebildet wird, das photometrisch erfasst werden kann. Die gemessene Absorption (Maximum bei 490 nm) korreliert gut mit der Stoffwechselaktivität und damit mit der Vitalität der Zellen.

Die Zellen wurden dazu in einer 96-well-Platte ausgesät und gemäß dem oben geschilderten Protokoll sowohl mit den entsprechenden Plasmiden mittels LT1 als auch

mit dem DNazym hgd40 mittels Escort/Chloroquine unter Hinzunahme von Negativkontrolle (Medium und Medium mit Transfektionsreagenzien) transfiziert.

In alle wells wurden anschließend 20 µl des CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagents gegeben und die Platte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Absorption des gebildeten Farbstoffs wurde zweimal im Abstand von einer Stunde im Photometer bei 490 nm bestimmt.

3.4.5 Analyse der Transfektionseffizienz von DNazym mittels FACS

Um die Transfektionseffizienz nach Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem DNazym hgd40 durch Escort/Chloroquine zu messen, konnte eine Analyse mittels Durchflusszytometrie im FACS durchgeführt werden.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen anhand ihrer Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften unterschieden werden können. Im FACS (Fluorescence-activated cell sorter) werden sie einzeln von einem Laserstrahl erfasst und dadurch kommt es zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern gebündelt und zerlegt werden. Für jeden Fluoreszenzfarbstoff bekommt man somit ein spezifisches Signal. Außerdem lässt sich unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung eine Aussage über die Größe der Zelle und ihre Granularität treffen. Als Maß für die Zellgröße dienen dabei die beim Auftreffen auf die Zelle nach vorne abgelenkten Strahlen (Forwardscatter FSC), als Maß für die Granularität die um 90° abgelenkten Strahlen (Sidescatter SSC).

Im durchgeführten Versuch erfolgte je 12 und 24 Stunden nach Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem Plasmid mittels LT1 die Transfektion mit FAM-markiertem hgd40 mittels Escort/Chloroquine. Nach weiteren 12 Stunden konnten die Zellen durch Zugabe von 150 µl Trypsin/EDTA und fünfminütiger Inkubation im Brutschrank gelöst werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl Zellmedium abgestoppt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 1300 rpm konnte das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich in 200 µl PBS gelöst und im FACS-Gerät auf Zellvitalität und Transfektionseffizienz untersucht werden.

3.5 Untersuchung der Genexpression auf Proteinebene

3.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Sowohl der Vektor GFP (Green Fluorescent Protein) als auch der mCherry-Vektor kodieren für ein fluoreszierendes Protein. Diese fluoreszierenden Stoffe, auch Fluochrome genannt, müssen zur Analyse von einem Laser mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, worauf sie wenige Nanosekunden später selbst Licht einer anderen, längeren und spezifischen Wellenlänge abstrahlen, das mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann. Es handelt sich bei der Fluoreszenzmikroskopie um eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, mit der zusätzlichen Möglichkeit, das bei Fluoreszenz emittierte Licht unter Verwendung spezieller Filter in das Okular des Mikroskops zu leiten und so zu beobachten oder mit einer Kamera aufzunehmen. GFP weist zwei Anregungsmaxima bei 395 und 475 nm auf, die Wellenlänge des emittierten Lichts beträgt 509 nm. Die Fluoreszenzmikroskopie kann direkt in den Wells einer 24-well-Platte ohne Entfernung des Zellmediums erfolgen.

3.5.2 Konfokale Lasermikroskopie

Der mCherry-Vektor besitzt ein Emissionsmaximum bei 610 nm und benötigt zur Anregung Licht in einem sehr spezifischen Wellenlängenbereich (587 nm). Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie konnten die Proteine mit Licht dieser Wellenlänge angeregt und entsprechende Bilder erzeugt werden. Ebenso war es möglich, die mit GFP transfizierten Zellen zu untersuchen.

Das konfokale Lasermikroskop ist vom Prinzip her ein Fluoreszenzmikroskop, das allerdings nie das gesamte Präparat beleuchtet, sondern stets nur bestimmte virtuelle Schnittebenen. Dabei wird das emittierte Licht an jedem untersuchten Punkt des Präparats einzeln detektiert und anschließend per Computer zu einem Gesamtbild verrechnet. So entsteht zu keinem Zeitpunkt ein vollständiges Bild im Mikroskop. Der Vorteil dieses Prinzips besteht darin, dass eine hohe axiale Auflösung erreicht wird und die unterschiedlichen virtuellen Schnittebenen zu einem präzisen dreidimensionalen Bild zusammengesetzt werden können.

Dazu wurden die Zellen in für die konfokale Lasermikroskopie verwendeten Chamber Slides ausgesät und gemäß dem obigen Protokoll mittels LT1 mit dem Plasmid transfiziert. Zur Fixierung der Zellen vor der Mikroskopie wurden sie nach Absaugen des Zellkulturmediums dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen, bevor in jedes well 1 ml

Paraformaldehyd-Lösung zur zwanzigminütigen Fixierung gegeben wurde. Anschließend mussten die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen werden. Zum Einbetten wurde der Randaufsatz der Chamber Slides entfernt und ca. 3 Tropfen PBS/Glycerol-Gemisch (Glycerol 90% im Verhältnis 2:3 mit PBS) auf den Träger gegeben. Das Deckglas konnte nun aufgesetzt und überschüssige Flüssigkeit mit etwas Zellstoff abgesaugt werden. Zur Versiegelung der Deckglasränder wurde Nagellack verwendet. Die E. coli konnten in LB-Medium oder Lysepuffer direkt auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt werden. Bei dem konfokalen Lasermikroskop handelte es sich um ein Zeiss Axiovert 100 M Mikroskop, an das zum Scannen ein Zeiss LSM 510 Scanning Device angeschlossen ist.

3.5.3 Fluoreszenzspektroskopie

Um Fluoreszenz auch quantitativ erfassen zu können, kann die Fluoreszenzspektroskopie mittels eines Fluorometers (hier POLARstar der Firma BMG) verwendet werden. Fluoreszierende Stoffe müssen auch hier mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden um anschließend das emittierte Licht einer anderen spezifischen Wellenlänge detektieren zu können. Der Aufbau des Geräts gleicht dabei einem Photometer; das abgegebene Licht wird allerdings in einem Winkel von 90° aufgenommen um Artefakte durch das anregende Licht zu verhindern.

Die mit dem mCherry-GATA-3-Vektor transformierten E. coli sowie unveränderte E. coli wurden in LB-Medium in die Wells einer für das Fluorometer benötigten schwarzen 96-well-Platten mit transparentem Grund pipettiert und daraufhin gemessen. So konnten der Nachweis einer erfolgten Transformation sowie die Auswahl desjenigen Bakterienklons mit dem intensivsten Signal zur Plasmidamplifikation erfolgen.

Die HEK-293-Zellen konnten direkt in der Platte ausgesät und gemäß obigem Protokoll mit dem Plasmid transfiziert werden. Zur Messung musste das Zellmedium zunächst entfernt und einmal mit 100 µl PBS pro well gewaschen werden. Dann wurden je 100 µl 1xLysis Puffer in jedes well gegeben um durch zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator eine Zelllyse zu erzielen. Anschließend konnten die Ansätze im Fluorometer analysiert werden. Es erfolgte stets der Vergleich mit einer Zellmedium- sowie Transfektionsreagenzkontrolle.

3.5.4 Lumineszenzspektroskopie

Der psiCheck-GATA-3-Vektor enthält kodierende Sequenzen für zwei Luciferasen, Firefly und Renilla, die ihr spezifisches Substrat in zwei Schritten zu einem Lumineszenz erzeugenden Produkt umsetzen können:

1. Luciferin + ATP \rightarrow Luciferyl + PP_i
2. Luciferyladenylat + O₂ \rightarrow Oxyluciferin + AMP + Licht

Da die Lumineszenz durch eine chemisch-enzymatische Reaktion in den Zellen direkt erzeugt wird, ist für ihre Messung keine Anregung durch Licht bestimmter Wellenlänge notwendig. Das emittierte Licht konnte mittels eines Luminometers (LUMIstar der Firma BMG Offenburg) detektiert werden. Im Gegensatz zum Fluorometer wird dabei die Gesamt-Emission ohne Filter gemessen und quantifiziert.

In den durchgeführten Versuchen wurde das Dual-GloTM Luciferase Assay System der Firma Promega verwendet. Die Zellen können dabei direkt in die für das Luminometer benötigten weißen 96-well-Platten mit transparentem Grund ausgesät werden.

Die Zugabe der Substrate erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst musste zu je 75 µl Zellmedium je well 75 µl Luciferase Reagent hinzugefügt werden. Ein Lysepuffer war darin bereits enthalten. Nach ca. zwanzigminütiger Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur konnte dann die Expression der Firefly-Luciferase im Luminometer untersucht werden. Anschließend wurde die durch sie katalysierte Reaktion mittels Zugabe von je 75 µl DualStop&Glo Reagent abgestoppt, um nach erneuter zwanzigminütiger Inkubation auf dem Schüttler die Messung der Aktivität der Renilla-Luciferase durchführen zu können. Die Analyse der DNAzym-spezifischen Suppression erfolgte durch Bildung des Quotienten aus der Aktivität der beiden Luciferasen.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durchgeführten Versuche erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad® Prism (San Diego, USA). Mit diesem Programm lassen sich parallel zur graphischen Darstellung der Ergebnisse deren Mittelwerte und Standardabweichung berechnen und entsprechend abbilden. Teilweise wurden bei der Auswertung zum besseren Vergleich der Daten Differenzen und Quotienten gebildet, dies ist bei der Darstellung der jeweiligen Ergebnisse beschrieben.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte ein einfaches Testsystem entwickelt werden, mit dem katalytische Aktivitäten sequenzspezifischer DNAzyme für ihre Ziel-RNA analysiert und somit die wirksamsten DNAzym-Moleküle identifiziert werden können.

Zum Zeitpunkt der experimentellen Phase der Arbeit existierte dafür noch kein standardisierbares *in vitro*-System. Diverse Ansätze basieren auf einem Nachweis der Spaltprodukte, sind aber mit hohem Aufwand vergesellschaftet. In unserer Arbeitsgruppe war bereits vor Planung dieser Arbeit die Idee entstanden, ein Testsystem unter Verwendung von Reportersystemen zu erstellen.

Reportersysteme enthalten Genabschnitte für fluoreszierende Proteine wie das Green Fluorescent Protein (GFP) oder für Luciferasen wie die Firefly- oder Renilla-Luciferase, die durch Klonierung mit anderen Genen oder Genfragmenten gekoppelt werden. Nach Transfektion in lebende Zellen kommt es dann zur Expression der gesamten Sequenz, die aus der Klonierung resultiert. Über Messung der Fluoreszenz bzw. der Lumineszenz kann so anschließend eine Aussage zur Expression der zu untersuchenden Genabschnitte getroffen werden (Greer und Szalay, 2002).

Um die Effizienz von DNAzymen untersuchen zu können, sollte die für das DNAzym spezifische Ziel-DNA in den Expressionsvektor einkloniert und dieser in lebende Zellen transfiziert werden. Anschließend erfolgt eine Behandlung der transfizierten Zellen mit dem DNAzym, durch welche die resultierende mRNA degradiert und damit eine Proteinexpression (entsprechend Fluoreszenz oder Lumineszenz) vermindert werden kann. Über die Messung des abgeschwächten Signals und Vergleich mit seiner Stärke vor Behandlung mit dem DNAzym soll dann eine Aussage zu dessen Effizienz getroffen werden können.

Letztlich ist es das Ziel, DNAzyme zur Behandlung von allergischem Asthma bronchiale zu etablieren, sodass auch zur Konstruktion der Testsysteme eine entsprechende spezifische Gensequenz verwendet wurde. In den Abläufen der Immunreaktion bis zur Ausbildung des klinischen Vollbilds der Erkrankung spielt der Transkriptionsfaktor GATA-3 eine entscheidende Rolle (s. 1.2). In unserer Arbeitsgruppe war eine humane GATA-3-Sequenz bereits vorhanden. Sie lag in Form von cDNA vor, die aus RNA GATA-3-exprimierender Jurkat-Zellen gewonnen worden war. Ebenso hatten Herr Dr. Serdar Sel und Frau Dr. Tanja Dicke bereits ein für diese Sequenz spezifisches, katalytisch aktives DNAzym, hgd40, etabliert. In vorherigen

Versuchen war ein Reportergensystem verwendet worden, das GFP enthielt. Über Klonierung war die humane GATA-3-Sequenz in den Vektor eingefügt worden. Nachdem Zelllinien mit dem resultierenden Expressionsvektor transfiziert worden waren, wurden sie mit hgd40 behandelt. Als Kontroll-DNAzym diente das bezüglich GATA-3 nicht katalytisch aktive ODN_g. Leider gelang keine differenzierte Aussage zum quantitativen Effekt des DNAzyms, da zur Suppression der Fluoreszenz große Mengen hgd40 notwendig waren, ab einer gewissen Menge aber sofort eine starke Signalabschwächung detektierbar war. Entsprechend waren konzentrationsabhängige Feinabstufungen der DNAzym-Wirkung nicht messbar. Aus diesem Grund musste man den Ansatz wieder verlassen und nach neuen Systemen suchen.

Die Wahl fiel auf zwei verschiedene Reportergenvektoren, in welche die GATA-3-Sequenz einkloniert werden sollte. Herr Prof. Dr. T. Sparwasser aus Hannover stellte uns dankenswerterweise den Vektor V.302creIREScherry (vereinfacht „mCherry-Vektor“) zur Verfügung, der eine Sequenz zur Expression des rot fluoreszierenden Proteins mCherry enthält. Das Fluoreszenzsignal ist nach Anregung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge und durch Einsatz entsprechender Filter quantitativ detektierbar. Nach Transfektion lebender Zellen mit dem mCherry-GATA-3-Expressionsvektor und anschließender Behandlung mit hgd40 sollte die resultierende mRNA degradiert und das rote Signal dadurch geschwächt werden. Auf diese Weise soll die Effizienz des DNAzyms gemessen werden.

Der zweite Expressionsvektor psiCheckTM2 (vereinfacht „psiCheck-Vektor“) enthält Gensequenzen für die Luciferasen Firefly und Renilla. Nach Expression dieser Enzyme und Umsetzung ihres spezifischen Substrats entsteht Lumineszenz, die quantitativ erfasst werden kann. Bei Firefly handelt es sich um eine Kontrollluciferase. Renilla ist die Luciferase, deren Expression über den Einsatz von hgd40 reguliert werden soll. Analog zum mCherry-GATA-3-Vektor wird erwartet, dass das Signal nach Degradation der mRNA durch Behandlung mit hgd40 geschwächt wird, sodass eine Aussage zur Effizienz des DNAzyms getroffen werden kann.

4.1 Konstruktion von Expressionsvektoren mit GATA-3

Die Klonierung des GATA-3-Inserts in den jeweiligen Expressionsvektor und die anschließende Transformation von E.coli-Bakterien wurde für beide Vektorsysteme (mCherry-Vektor und psiCheck-Vektor) nach demselben Protokoll durchgeführt (s. 3.3). Zunächst mussten die Plasmide linearisiert werden, um die GATA-3-Sequenz in

die Vektoren einfügen zu können. Hierzu wurden bestimmte Schnittstellen ausgewählt, EcoRV für den mCherry-Vektor und NotI für den psiCheck-Vektor. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRV und NotI gelang dann durch Restriktionsverdau die Linearisierung der Plasmide. Analog wurden den GATA-3-Sequenzen die passenden EcoRV- bzw. NotI-Schnittstellen endständig mittels PCR und den entsprechenden Primern angefügt. Das GATA-3-PCR-Produkt wurde zunächst mithilfe des TOPO TA Cloning Kits[®] in den linearisierten pCR[®]2.1-Vektor[®] einkloniert. Das resultierende Plasmid wurde dann mit dem jeweils passenden Restriktionsenzym an den exakten Enden geschnitten. Um eine Selbstligation der linearisierten Plasmide mCherry bzw. psiCheck zu verhindern, erfolgte eine Dephosphorylierung an deren 5'-Ende. Aus dem gleichen Grund wurden bei der anschließenden Ligation mittels T4-Ligase drei verschiedene Ligationsansätze mit unterschiedlichen Verhältnissen von Plasmid zu Insert gewählt. Auf diese Weise sollten die günstigsten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Klonierung geschaffen werden. So wurden linearisiertes Plasmid und Insert im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:3 zur Ligation eingesetzt. Danach erfolgte die Transformation der E. coli-Bakterien.

Die entsprechend der drei Ligationsansätze unterschiedlichen Transformationsansätze wurden anschließend getrennt voneinander kultiviert. Aus den resultierenden Bakterienkulturen wurden 30 Klone (10 Klone je Ligationsansatz) für die weitere Amplifikation selektiert. Schließlich erfolgte aus diesen 30 Klonen die Auswahl desjenigen Klons, der die höchste Transformationsquote mit dem Expressionsvektor aufwies und sich daher für die geplante Transfektion der HEK-293-Zellen am besten eignete.

4.1.1 Nachweis einer erfolgreichen Konstruktion des mCherry-GATA-3-Vektors

Zum Nachweis einer erfolgreichen Klonierung und Transformation des mCherry-GATA-3-Vektors erfolgte zunächst ein Kontrollverdau aller 30 generierten Klone. Das Plasmid wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits aus den Bakterien aufgereinigt. Anschließend wurde es mit dem Restriktionsenzym EcoRV versetzt, mit dem auch der mCherry-Vektor linearisiert und so auf den Einbau des GATA-3-Abschnitts vorbereitet worden war. Bei Vorhandensein von GATA-3 im mCherry-Vektor sollten durch den Verdau Fragmente von 1260 bp Länge entstehen. Mittels Gelelektrophorese und anschließender Beurteilung des Gels unter UV-Licht konnten diejenigen Klone identifiziert werden, die im Gelbild eine GATA-3-spezifische Bande

4. Ergebnisse

aufwiesen und somit diesen Abschnitt im Expressionsvektor enthalten. Dies traf auf insgesamt 25 der 30 Klone zu. Dargestellt ist das Gelbild des Kontrollverdaus des mCherry-GATA-3-Vektors aus den E.coli-Klonen 1-10 des Ligationsansatzes 1:3. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Klone K1, 2, 4, 5, und 7-9 dieses Ansatzes den mCherry-GATA-3-Vektor enthalten. Zum Vergleich wurde eine Gelelektrophorese mit den unverdauten Plasmiden durchgeführt (s. Abb. 9).

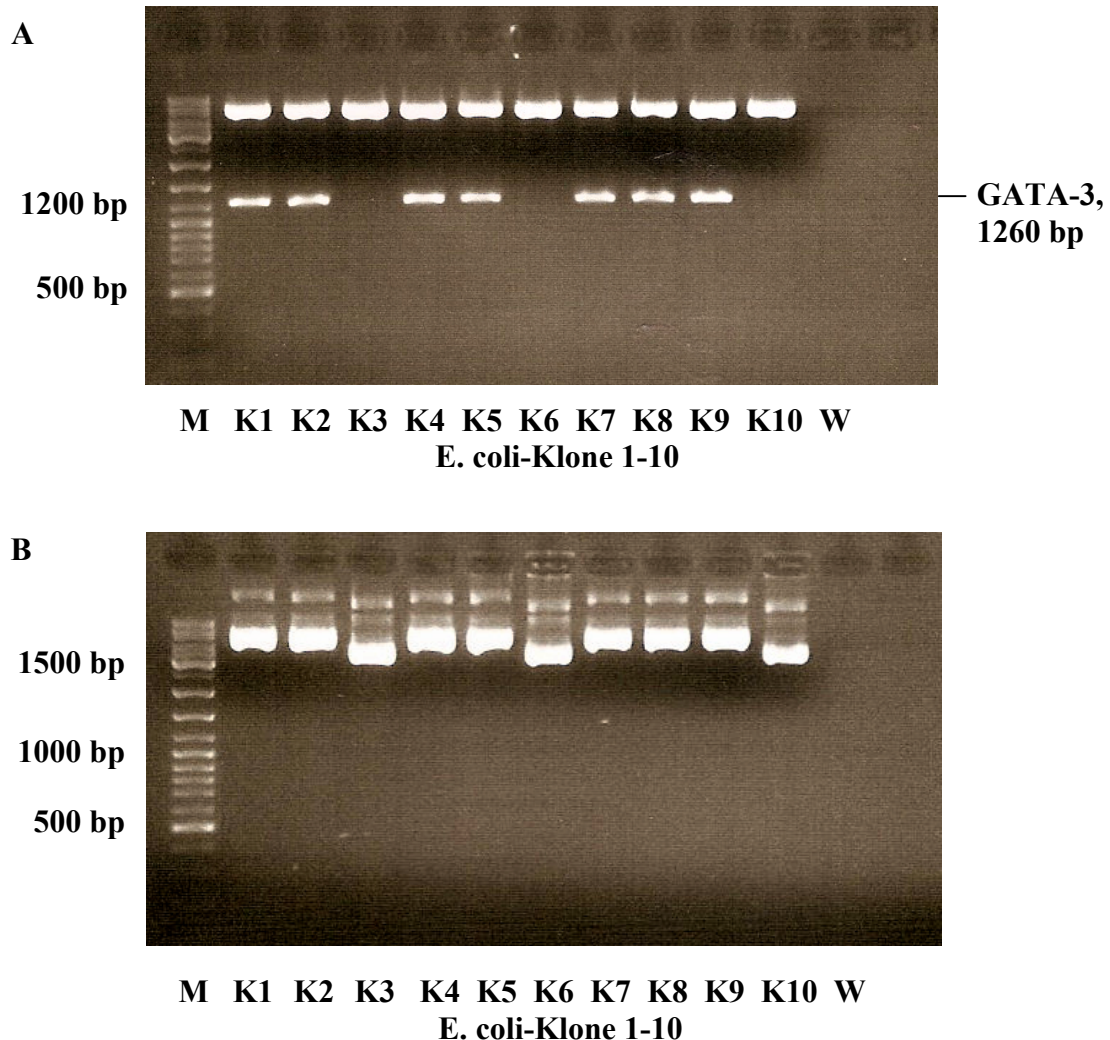


Abb. 9 Kontrollverdau des mCherry-GATA-3-Vektors mit EcoRV

Es erfolgte ein Kontrollverdau des mCherry-GATA-3-Vektors aus den E.coli-Klonen 1-10 (K1-10) des Ligationsansatzes 1:3. Durch den Verdau mit EcoRV entstand bei Vorhandensein von GATA-3 im mCherry-GATA-3-Vektor ein Fragment mit einer Länge von 1260 bp. Mittels Gelelektrophorese und anschließender Beurteilung unter UV-Licht konnte nachgewiesen werden, dass die Klone K1, 2, 4, 5, und 7-9 den mCherry-GATA-3-Vektor enthalten (A). Zum Vergleich erfolgte eine Gelelektrophorese des unverdauten mCherry-GATA-3-Vektors aus denselben Klonen. Unter UV-Licht konnte keine entsprechende GATA-3-Bande identifiziert werden (B). Bei M handelt es sich um den Marker. Als Negativkontrolle wurde Wasser (W) aufgetragen.

4. Ergebnisse

Nachfolgend musste geprüft werden, ob das GATA-3-Insert bei diesen Klonen in der korrekten Orientierung im Vektor enthalten ist. Dies geschah über eine Sequenzierung. Dazu wurden 5 der 25 Klone ausgewählt, mit einem entsprechenden Sequenzierungsprimer versetzt durch die Firma AGOWA sequenziert. Es konnte bestätigt werden, dass alle 5 Klone das GATA-3-Insert in der richtigen Orientierung enthalten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die sequenzierten Abschnitte die erforderlichen Schnittstellen für die DNAzyme hgd40 und gd21 aufweisen (nicht dargestellt).

Im nächsten Schritt sollte von den 5 erfolgreich transformierten Klonen derjenige ausgewählt werden, der die höchste Fluoreszenz zeigt. Quantitativ konnte die Fluoreszenz der mit dem mCherry-GATA-3-Vektor transformierten Klone mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie abgebildet werden. Bei diesem Verfahren wird zur Anregung Licht einer spezifischen Wellenlänge eingesetzt, um dann das Fluoreszenzsignal in seiner spezifischen Emissionswellenlänge detektieren zu können. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte E.coli in LB-Medium. Die Signalintensität wird vom Gerät als Zahlenwert angegeben und somit vergleichbar gemacht (s. Abb. 10).

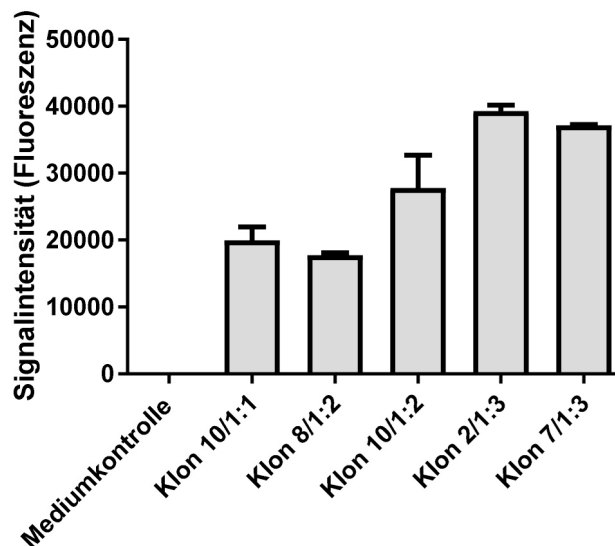


Abb. 10 Fluoreszenzspektroskopie der mit mCherry-GATA-3-Vektor transformierten E.coli-Klone
Dargestellt ist die Signalintensität der Fluoreszenz von 5 nachweislich mit dem mCherry-GATA-3-Vektor transformierten E.coli-Klonen. Als Kontrolle dienten unbehandelte E.coli in LB-Medium (Mediumkontrolle). Die Verhältnis-Angaben 1:2; 1:2 und 1:3 beziehen sich auf die Zusammensetzung des Ligationsansatzes aus dem linearisiertem mCherry-Plasmid und dem GATA-3-Insert. Dabei wurden Plasmid und Insert im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:3 zur Ligation eingesetzt und anschließend transformiert. Von den resultierenden E.coli-Klonen waren pro Ansatz 1:1, 1:2 und 1:3 je 10 Klone (Klon 1-10) weiter kultiviert worden. Mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung waren anschließend die dargestellten 5 erfolgreich transformierten Klone selektiert worden. Von ihnen weist Klon 2 des Ansatzes 1:3 die höchste Signalintensität auf.

4. Ergebnisse

Der Klon 2 des Ligationsansatzes 1:3 wurde für die nachfolgenden Versuche mit dem mCherry-GATA-3-Vektor ausgewählt, da er das GATA-3-Insert in der richtigen Orientierung enthält und in der Fluoreszenzspektroskopie die höchste Fluoreszenz zeigte. Zur Amplifikation des Plasmids wurde eine Hauptkultur des Bakterienklons K2, 1:3 angelegt und das Plasmid am Folgetag unter Verwendung des HiSpeed Plasmid Maxi Kits aufgereinigt.

Nachdem der Nachweis von mCherry durch Messung der Fluoreszenz auf Proteinebene erfolgt war, gelang ergänzend die Darstellung auf DNA-Ebene durch eine PCR zur Amplifikation der Vektor-DNA. Das Plasmid wurde im Verhältnis 1:100.000 verdünnt, um in der anschließenden Gelelektrophorese eindeutige Banden zu erzielen. Die PCR erfolgte unter Einsatz von Cherry-Primern, die so konzipiert waren, dass das resultierende mCherry-Produkt 151 bp aufwies. Als Negativkontrolle diente Wasser (s. Abb. 11).

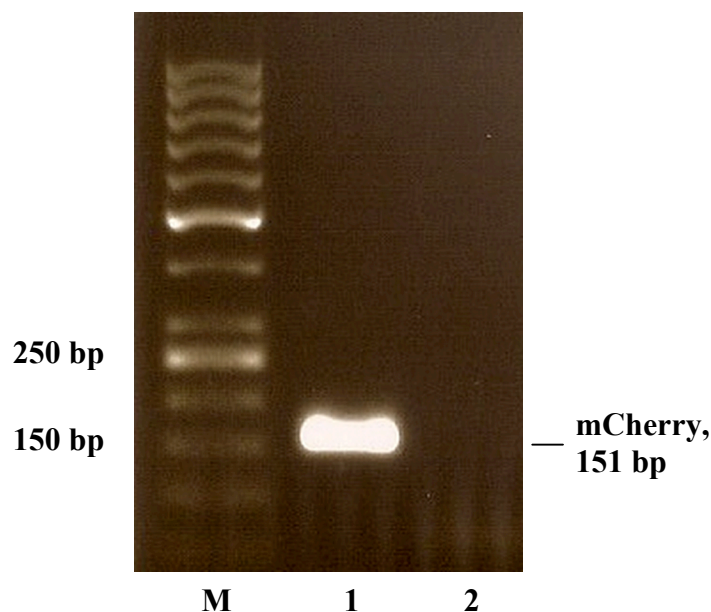


Abb. 11 Nachweis von mCherry-DNA im mCherry-GATA-3-Vektor mittels PCR

Um das Vorhandensein von mCherry im mCherry-GATA-3-Vektor auf DNA-Ebene nachzuweisen, erfolgte eine PCR der Plasmid-DNA mit entsprechenden Cherry-Primern. Dargestellt ist das Ergebnis der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese. Das Plasmid wurde im Verhältnis 1:100.000 verdünnt, um eine eindeutige Bande zu erzielen. Die Cherry-Primer waren so konzipiert, dass das resultierende Fragment eine Länge von 151 bp aufwies. Unter UV-Licht ließ sich eine entsprechende Bande identifizieren. Bei M handelt es sich um den Marker. Als Negativkontrolle wurde Wasser (2) aufgetragen.

Der GATA-3-Abschnitt war bereits nach Restriktionsverdau des Expressionsvektors mCherry-GATA-3 gelelektrophoretisch abgebildet worden (s. Abb. 9). Nun sollte analog zum PCR-Nachweis von mCherry das gesamte mCherry-GATA-3-Produkt direkt aus dem Plasmid dargestellt werden. Hierzu wurde eine PCR unter Zuhilfenahme

4. Ergebnisse

des Sense-Primers für mCherry und des Antisense-Primers für GATA-3 durchgeführt. Das Plasmid wurde wieder im Verhältnis 1:100.000 verdünnt, um eindeutigere Banden zu erhalten. In der anschließenden Gelelektrophorese wurde parallel der PCR-Ansatz zum Nachweis von mCherry auf das Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle diente Wasser. Der Nachweis des gesamten mCherry-GATA-3-Produkts aus dem Plasmid gelang allerdings nicht (s. Abb. 12).

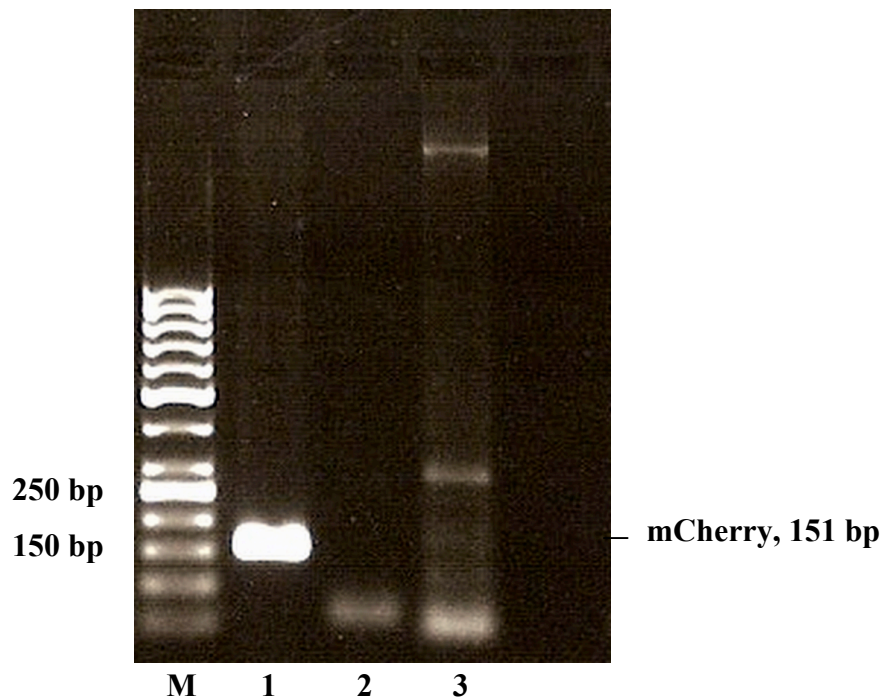


Abb. 12 PCR unter Zuhilfenahme des Sense-Primers für Cherry und des Antisense-Primers für GATA-3 zum Nachweis der Gesamtsequenz mCherry-GATA-3 im mCherry-GATA-3-Vektor

Die Gesamtsequenz aus mCherry und GATA-3 sollte mittels einer PCR unter Zuhilfenahme des Sense-Primers für Cherry und des Antisense-Primers für GATA-3 und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung dargestellt werden. Um eine eindeutigere Bande zu erzielen, wurde das Plasmid im Verhältnis 1:100.000 verdünnt. Parallel zu diesem mCherry-GATA-3-Ansatz (3) wurde der PCR-Ansatz zum Nachweis von mCherry aus dem Plasmid aufgetragen (1). Die Cherry-Primer waren so konzipiert, dass das resultierende Fragment eine Länge von 151 bp aufwies. Die kräftige Bande am unteren Gelrand der Probe 3 stellt die Primer dar, die Banden knapp oberhalb von 250 bp und unterhalb der Geltasche sind unklar. Bei M handelt es sich um den Marker, als Negativkontrolle wurde Wasser (2) aufgetragen.

4.1.2 Nachweis einer erfolgreichen Konstruktion des psiCheck-GATA-3-Vektors

Klonierung und Transformation zur Konstruktion des psiCheck-GATA-3-Vektors verliefen analog zur Konstruktion des mCherry-GATA-3-Vektors (s. 4.1.1).

Der Nachweis einer erfolgreichen Transformation erfolgte auch für den psiCheck-GATA-3-Vektor mittels Kontrollverdau der ausgewählten 30 Bakterienklone. Diese Zahl resultiert, wie auch bei den für den mCherry-GATA-3-Vektor untersuchten Klonen, aus der Tatsache, dass 3 Ligationsansätze verwendet (Verhältnis von Plasmid

und Insert 1:1, 1:2 und 1:3) und von den anschließend transformierten E.coli pro Ligationsansatz 10 Klone ausgewählt worden waren.

Zur Klonierung war das psiCheck-Plasmid mit Hilfe des Restriktionsenzym NotI linearisiert worden. Das GATA-3-Insert hatte mittels PCR mit entsprechend modifizierten Primern die passenden NotI-Schnittstellen erhalten. Entsprechend konnte der Kontrollverdau nach Aufreinigung des Plasmids über Einsatz des Restriktionsenzym NotI erfolgen. Im Anschluss wurden linearisiertes Plasmid und GATA-3-Insert elektrophoretisch aufgetrennt und die resultierenden Banden unter UV-Licht dargestellt. Die Länge des resultierenden Fragmentes nach Verdau mit NotI sollte ca. 800 bp betragen. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Plasmide zusätzlich ohne vorherigen Kontrollverdau auf das Gel aufgetragen. Von den 10 transformierten E.coli-Klonen zeigte nur Klon 4 des Ligationsansatzes 1:3 die Gelbande für GATA-3 bei 800 bp (s. Abb. 13).

Durch eine Gensequenzierung von Klon 4 durch die Firma AGOWA erfolgten die Bestätigung einer erfolgreichen Transformation und der Nachweis von GATA-3 an der vorgesehenen Stelle und in richtiger Orientierung. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die erforderliche Schnittstelle für hgd40 in der Sequenz vorhanden ist (nicht dargestellt).

Anders als bei der Fluoreszenz durch mCherry-GATA-3 ist ein direkter Nachweis der Lumineszenz aus den Bakterien nicht durchführbar, da eine Enzymproduktion und der anschließende Umsatz eines Substrats in ein lumineszierendes Produkt nur in lebenden Zellen möglich ist. Ein quantitativer Nachweis auf Proteinebene wie die Fluoreszenzspektroskopie der mit dem mCherry-GATA-3-Vektor transformierten E.coli war also nicht möglich.

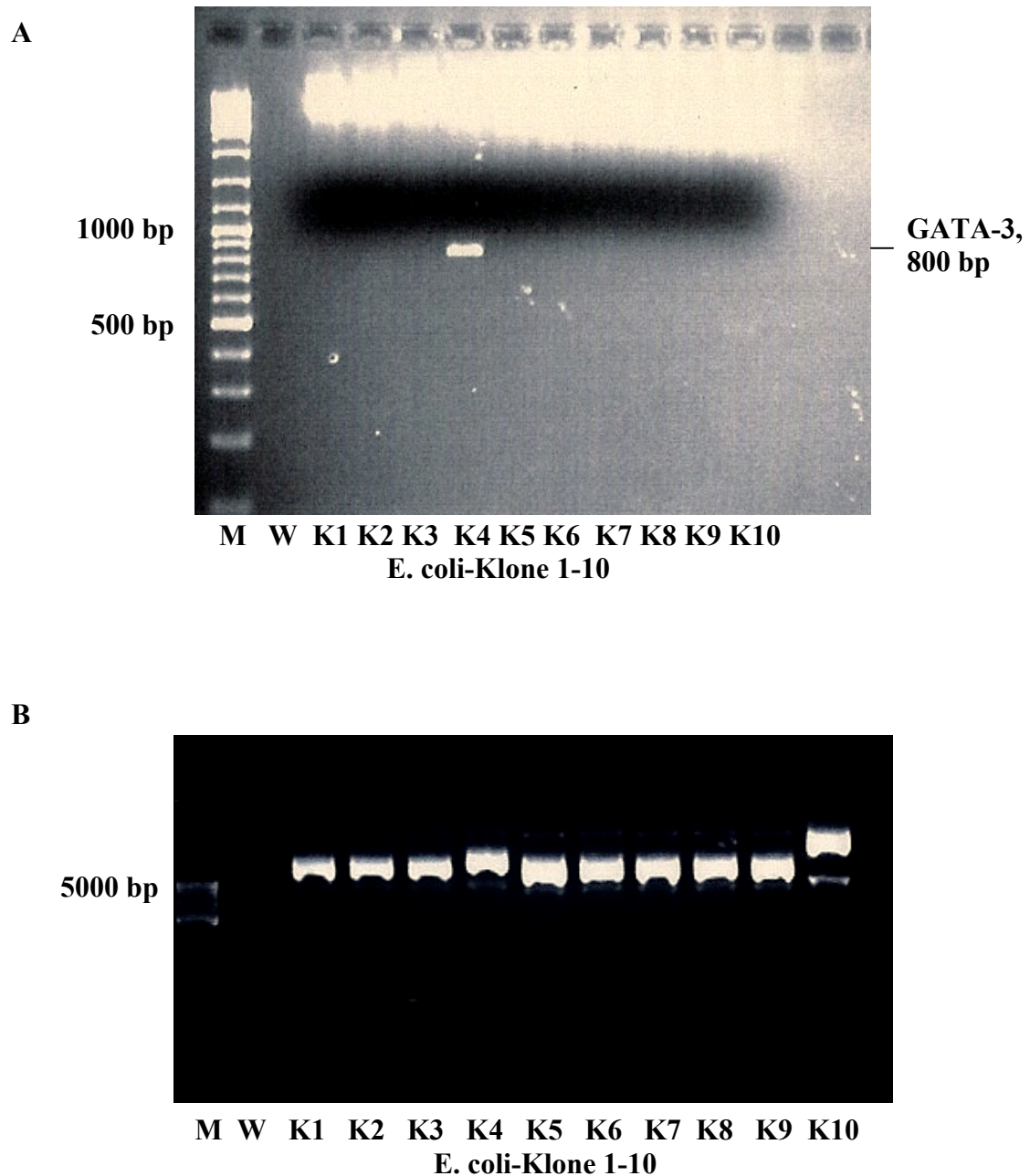


Abb. 13 Kontrollverdau des psiCheck-GATA-3-Vektors mit NotI

Es erfolgte ein Kontrollverdau des psiCheck-GATA-3-Vektors aus den E.coli-Klonen 1-10 (K1-10) des Ligationsansatzes 1:3. Durch den Verdau mit NotI entstand bei Vorhandensein von GATA-3 im psiCheck-GATA-3-Vektor ein Fragment mit einer Länge von 800 bp. Mittels Gelelektrophorese und anschließender Beurteilung unter UV-Licht konnte nachgewiesen werden, dass nur Klon 4 den psiCheck-GATA-3-Vektor enthält (A). Zum Vergleich erfolgte eine Gelelektrophorese des unverdauten psiCheck-GATA-3-Vektors aus denselben Klonen. Unter UV-Licht konnte keine entsprechende GATA-3-Bande identifiziert werden (B). Bei M handelt es sich um den Marker. Als Negativkontrolle wurde Wasser (W) aufgetragen.

4.2 Transfektion von HEK-293-Zellen mit den Expressionsvektoren

Im nächsten Schritt wurden die Expressionsvektoren in verschiedene Zelllinien eingebracht, um über eine anschließende Behandlung der Zellen mit dem DNazym eine Degradierung der entsprechenden mRNA zu erreichen und darüber die Effizienz des DNazyms messbar zu machen. Initial wurden die Zelllinien COS-7, A549 und HEK-293 eingesetzt, im weiteren Verlauf außerdem HeLa. Bezüglich ihres Wachstumsverhaltens, der Transfektionseffizienz und der Eignung für die spätere Messung von Fluoreszenz und Lumineszenz erwies sich die humane Nierenepithelzelllinie HEK-293 als die geeignetste. HeLa-Zellen zeigten ähnlich gute Eigenschaften bei der Transfektion und Messung wie die HEK-293-Zellen.

Zur weiteren Transfektionsoptimierung wurden die Zellen probeweise in unterschiedlicher Dichte ausgesät und 24 Stunden später lichtmikroskopisch beurteilt. Je nach Wachstum in den Kulturflaschen wurden später Konzentrationen von 3×10^5 /ml bis 4×10^5 /ml für die Versuche verwendet. Zur Transfektion der Zellen mit dem Expressionsvektor wurde zunächst das lipophile Transfektionsreagenz LT1 eingesetzt. Die Durchführung der Transfektion erfolgte gemäß Herstellerangaben (s. 3.4.3.1).

4.2.1 Nachweis einer erfolgreichen Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem mCherry-GATA-3-Vektor

Die erfolgreiche Transfektion der HEK-293-Zellen sollte initial mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Die Zellen wurden hierzu in schwarzen 96-well-Platten ausgesät und gemäß Protokoll 24 Stunden nach Aussaat mit LT1 und dem Expressionsvektor transfiziert. Der Fluoreszenznachweis am Folgetag mittels Fluoreszenzspektroskopie gelang allerdings nicht. Auch eine Zelllyse vor der Untersuchung war nicht hilfreich. Es ist davon auszugehen, dass entweder die Transfektionseffizienz oder die Menge des durch die Zellen produzierten Proteins zu klein für dieses Nachweisverfahren war. Ebenso wenig konnte ein rotes Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop gesehen werden (nicht dargestellt).

Um auszuschließen, dass die Transfektionsmethode und nicht die Nachweismethode ein Problem darstellte, wurden HEK-293-Zellen mit einem GFP-Plasmid unter Anwendung von LT1 und dem dazugehörigen Protokoll transfiziert. GFP weist zwei Anregungsmaxima bei 395 nm und 475 nm auf. Hier konnte in der Fluoreszenzmikroskopie unter entsprechender Anregung eindeutig ein grünes Signal beobachtet werden. Demnach erscheint der Transfektionsansatz mit LT1 generell

geeignet, sodass ein sensitiveres Verfahren zur Detektion der Fluoreszenz des mCherry-Proteins gesucht werden musste.

Die Durchflusszytometrie mittels FACS erwies sich wegen fehlender Anregbarkeit der Fluoreszenz für mCherry als nicht geeignet. Schließlich gelang der qualitative Nachweis einer Expression von mCherry und damit einer erfolgreichen Transfektion mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. Bei dieser speziellen Art der Fluoreszenzmikroskopie werden stets nur bestimmte Schnittebenen des Präparats beleuchtet, sodass eine hohe axiale Auflösung erzielt werden kann. Durch Verwendung zusätzlicher Filter ist außerdem die Einstellung der spezifischen Anregungswellenlänge möglich. Es wurden sowohl Zellen untersucht, die nur mit dem mCherry-Vektor transfiziert worden waren, als auch jene, die den Expressionsvektor mCherry-GATA-3 enthalten sollten. Als Negativkontrolle dienten nur mit Nährmedium versetzte Zellen. Da sich in den ersten Untersuchungen auch in den Kontrollen rote Fluoreszenz nachweisen ließ, wurde das normalerweise rote Nährmedium durch ein farbloses ersetzt, welches kein Phenolrot enthält. Das Problem konnte dadurch behoben werden. Außerdem wurden Zellen untersucht, die nur mit dem Transfektionsreagenz LT1 ohne Zusatz des Expressionsvektors und Escort/Chloroquine behandelt waren. Bei letztgenannter Kombination handelt es sich um den Transfektionsansatz, mit dem später das DNAzym transfiziert werden sollte und der im Verlauf näher erläutert wird.

Die HEK-293-Zellen wurden für die Analyse mit dem konfokalen Lasermikroskop direkt in so genannte Chamber Slides (Objektträger mit Aufsatz zum Einfüllen von Suspensionszellen in Nährmedium) ausgesät und darin nach Protokoll transfiziert. Anschließend wurden die Aufsätze abgenommen und die Zellen auf dem Objektträger fixiert. Bei der Analyse erfolgt zunächst eine Darstellung der Zellen unter Durchlicht und nachfolgend eine spezifische Anregung mit dem Laser zur Detektion von Fluoreszenz (s. Abb. 14). Auch hier war in nur wenigen Zellen ein ausgeprägtes Signal sichtbar. Dies bekräftigt die Annahme aus der vorher durchgeführten Fluoreszenzspektroskopie, dass entweder die Transfektionseffizienz oder die Proteinsynthese nicht ausreichend waren, um einen entsprechenden Nachweis zu erbringen.

Zum Vergleich und zur Überprüfung einer Eignung dieses Nachweisverfahrens wurden E.coli untersucht, die mit dem mCherry-Vektor und mit dem mCherry-GATA-3-Vektor transformiert worden waren. Diese zeigten deutliche Fluoreszenz. Eine suffiziente

Anregung und Detektion des emittierten Signals durch das konfokale Lasermikroskop ist demnach gegeben (s. Abb. 15).

Da die Transfektionsrate der HEK-293-Zellen unter Einsatz von LT1 nur mäßig war, wurden alternative Ansätze gesucht. Hierzu wurden die Zellen unter Einsatz verschiedener lipophiler Transfektionsreagenzien mit dem mCherry-Vektor, dem mCherry-GATA-3-Vektor und dem GFP-Vektor transfiziert. Ziel war, die Effizienz der unterschiedlichen Substanzen zu vergleichen und ggf. durch den Austausch von LT1 gegen ein anderes Transfektionsreagenz eine höhere Transfektionseffizienz zu erzielen.

Ein erster Vergleich des Transfektionserfolges erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Da eine Anregung von mCherry mit dieser Methode nicht möglich war, wurden die Zellen unter Anwendung verschiedener Transfektionsprotokolle mit dem GFP-Vektor transfiziert. Einige Transfektionsreagenzien wurden nach dieser qualitativen Analyse aufgrund einer zu niedrigen Transfektionsrate (Genejuice, Lipofectamine) oder einer zu hohen Zytotoxizität (DOTAP) sofort ausgeschlossen.

In einem anschließenden Versuch sollte LT1 nur mit den beiden lipophilen Transfektionsreagenzien PEI und Tfx verglichen werden. Die Zellen wurden dazu erneut mit dem GFP-Vektor transfiziert, um eine Fluoreszenzmikroskopie durchführen zu können. Hier zeigte sich nur bei den mit LT1 behandelten Zellen ein deutliches intrazelluläres Signal.

Parallel erfolgte die Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem mCherry-Vektor und dem mCherry-GATA-3-Vektor, ebenfalls unter Einsatz von LT1, PEI und Tfx. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie. Auch hier konnte keine eindeutige Überlegenheit von Tfx und PEI gegenüber LT1 gezeigt werden (nicht dargestellt). Die Vor- und Nachteile der Transfektionsreagenzien sind in Tabelle 6 zusammengefasst (s. 5.2.2).

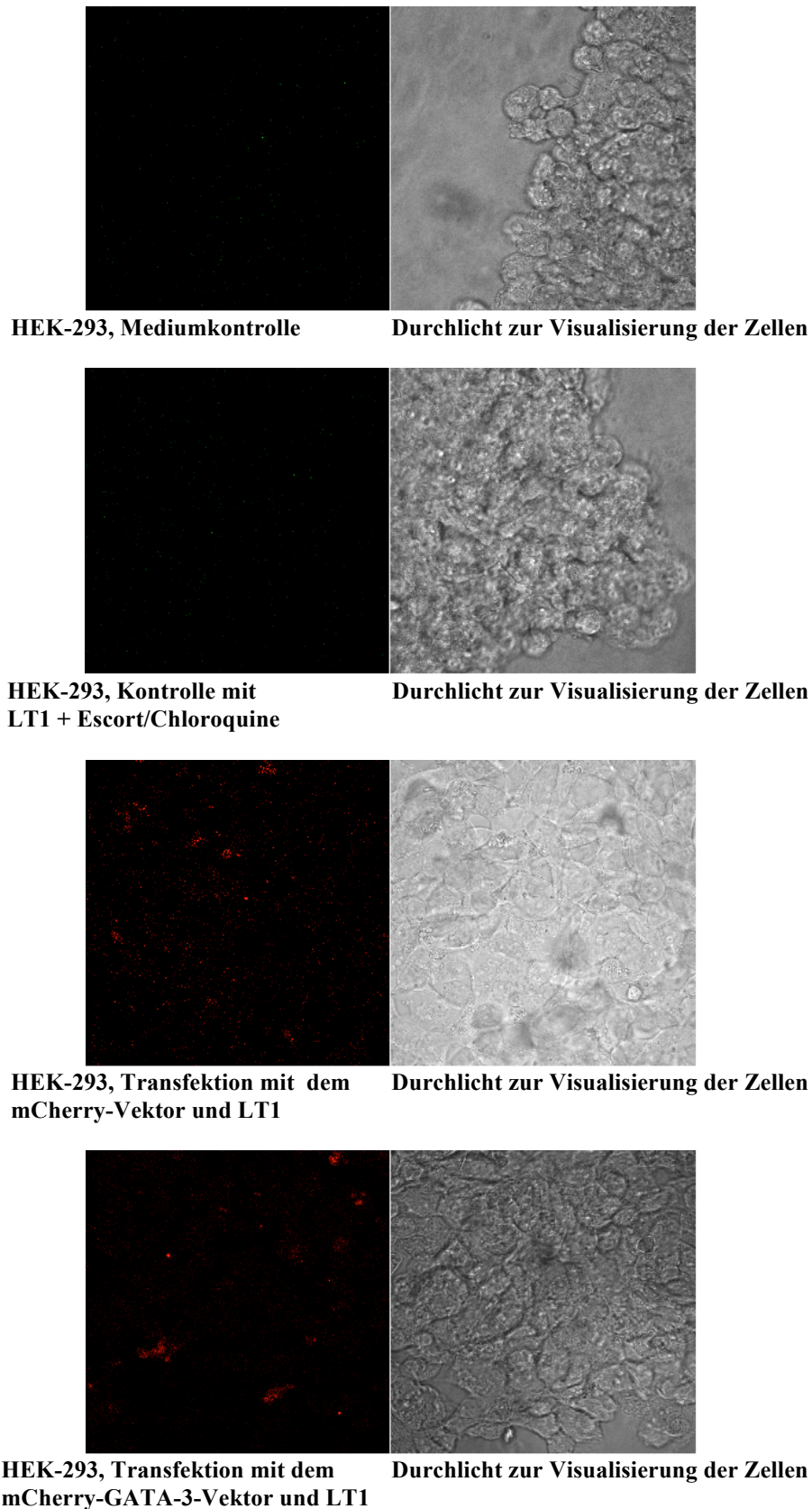


Abb. 14 Konfokalmikroskopie von HEK-293-Zellen, welche mit dem mCherry-Vektor oder dem mCherry-GATA-3-Vektor transfiziert wurden

Dargestellt ist jeweils die Anregung der HEK-293-Zellen durch den Laser (links) sowie eine Aufnahme unter Durchlicht zur Visualisierung der Zellen (rechts). Erfolgreich mit dem mCherry-Vektor bzw. dem mCherry-GATA-3-Vektor transfizierte Zellen leuchten unter Laseranregung rot, unbehandelte bzw. nur mit den Transfektionsreagenzien LT1 und Escort/Chloroquine behandelte Zellen emittieren kein Signal.

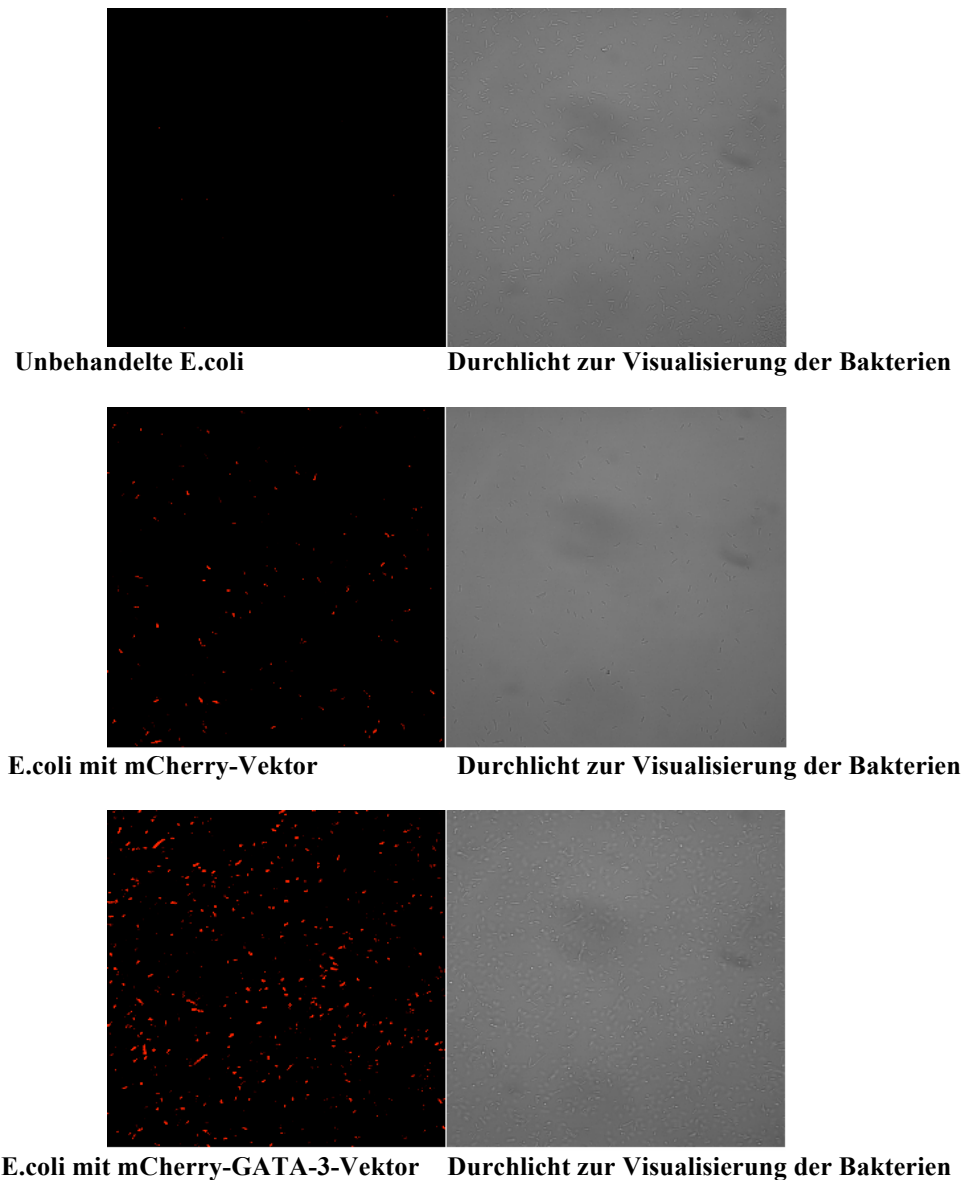


Abb. 15 Konfokalmikroskopie von E.coli-Bakterien, welche den mCherry-Vektor oder den mCherry-GATA-3-Vektor enthalten

Dargestellt ist jeweils die Anregung der Bakterien durch den Laser (links) sowie eine Aufnahme unter Durchlicht zur Visualisierung der Bakterien (rechts). Erfolgreich mit dem mCherry-Vektor bzw. dem mCherry-GATA-3-Vektor transformierte E.coli leuchten unter Anregung rot, unbehandelte E.coli emittieren kein Signal.

Es wird deutlich, dass sich der Nachweis einer zellulären Expression von mCherry auf Proteinebene schwierig gestaltet, sodass eine Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene durchgeführt werden sollte. Dies sollte über eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung geschehen. Auch bei dieser Analyse sollte der Transfektionserfolg von LT1, PEI und Tfx verglichen werden, sodass die HEK-293-Zellen unter Einsatz dieser Transfektionsreagenzien mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor transfiziert wurden. Als Negativkontrolle dienten nur mit Nährmedium behandelte Zellen und Wasser.

4. Ergebnisse

Nach Zelllyse, RNA-Aufreinigung und reverser Transkription erfolgte eine PCR zum Nachweis von mCherry-DNA. Die Cherry-Primer waren so konzipiert, dass ein PCR-Produkt von 151 bp Länge resultieren sollte. Auf diese Weise konnte schließlich gezeigt werden, dass die Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem mCherry- und dem mCherry-GATA-3-Vektor für jedes der 3 getesteten Transfektionsreagenzien (LT1, PEI und Tfx) erfolgreich war (s. Abb 16). Als Kontrolle für eine generelle Genexpression der Zellen wurde das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet (nicht abgebildet).

Im Gelbild kann nur ein qualitativer Nachweis erfolgen. Um eine *quantitative* Aussage bzgl. der Genexpression treffen zu können, wurde im Anschluss eine quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierzu wurden dieselben Primer wie in der qualitativen PCR verwendet. Auch hier gelang der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem mCherry-Vektor und dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels LT1, PEI und Tfx.

An der unterschiedlichen Höhe der Balken wird allerdings deutlich, dass Tfx zwar für den mCherry-Vektor die höchste Transfektionseffizienz aufweist, insgesamt aber LT1 in Hinblick auf den mCherry-GATA-3-Vektor erfolgreicher ist. PEI zeigt insgesamt die niedrigste Transfektionsrate (s. Abb. 17).

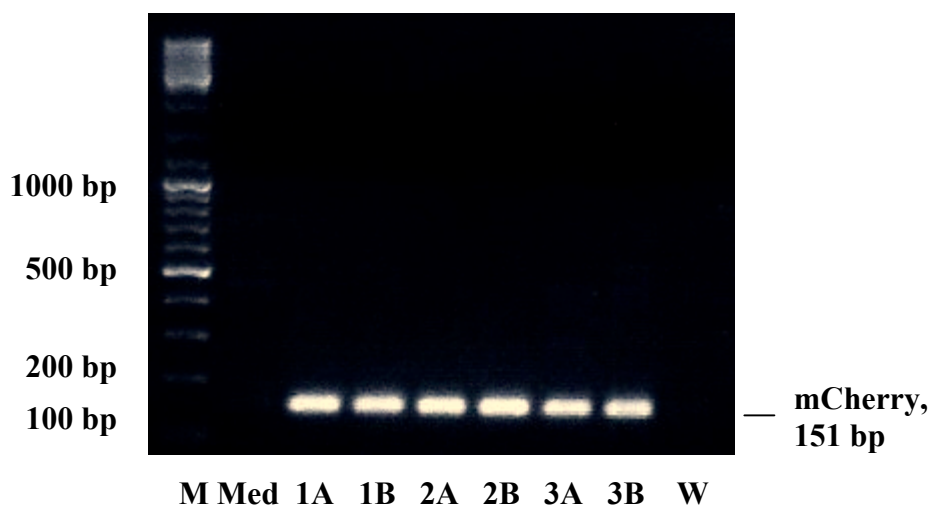


Abb. 16 Analyse der Expression von mCherry in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels RT-PCR (dargestellt für die Transfektionsreagenzien LT1, PEI, Tfx). Die HEK-293-Zellen wurden jeweils mit dem mCherry-Vektor (A) oder dem mCherry-GATA-3-Vektor (B) transfiziert. Hierzu wurden die Transfektionsreagenzien LT1 (1), PEI (2) und Tfx (3) verwendet. Mit der aus den Zellen aufgereinigten RNA erfolgte nach reverser Transkription eine PCR unter Einsatz von Cherry-Primern, die so konzipiert waren, dass das resultierende Fragment eine Länge von 151 bp aufwies. Dargestellt ist die Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Als Negativkontrollen dienten nur mit Nährmedium behandelte Zellen (Med) und Wasser (W). Bei M handelt es sich um den Marker. Bezüglich aller 3 untersuchten Transfektionsreagenzien zeigte sich eine erfolgreiche Transfektion beider Vektoren.

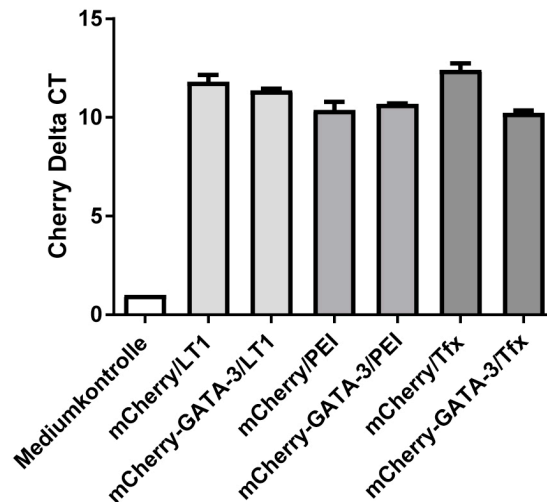


Abb. 17 Analyse der Expression von mCherry in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels qRT-PCR (dargestellt für die Transfektionsreagenzien LT1, PEI, Tfx). Die HEK-293-Zellen wurden mit Hilfe der Transfektionsreagenzien LT1, PEI und Tfx mit dem mCherry-Vektor oder dem mCherry-GATA-3-Vektor transfiziert. Mit der aus den Zellen aufgereinigten RNA erfolgte nach reverser Transkription eine qPCR unter Einsatz von Cherry-Primern. Die Expression von mCherry ist als Mittelwert zweier Transfektionsansätze und in Bezug auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH (ausgedrückt als Delta CT) dargestellt. Der Wert für die Mediumkontrolle wurde aus Gründen der Übersicht auf 1 gesetzt. Für alle 3 untersuchten Transfektionsreagenzien zeigte sich eine erfolgreiche Transfektion der Vektoren.

Letztlich fiel die Wahl auf das Transfektionsreagenz LT1, da der Transfektionserfolg für mCherry-GATA-3 entscheidend ist. Zudem ist es kostengünstiger als Tfx, einfach in der Handhabung und zeigte die höchste Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Um ergänzend nachzuweisen, dass auch das GATA-3-Insert enthalten ist und von den HEK-293-Zellen exprimiert wird, erfolgte eine weitere PCR. Hierzu wurde cDNA aus den zuvor geschilderten Versuchen zum Vergleich verschiedener Transfektionsreagenzien eingesetzt. Es wurden GATA-3-Primer verwendet, die ein Produkt von ca. 100 bp Länge erzeugen sollten. Nach der PCR erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung. Als Positivkontrolle für GATA-3 diente cDNA aus Hut-78-Zellen, als Negativkontrolle nur mit Nährmedium behandelte Zellen und Wasser. Es fallen schwache Banden in den Ansätzen auf, die nur den mCherry-Vektor ohne einkloniertes GATA-3-Insert enthalten, sodass der Nachweis nicht eindeutig gelingt (s. Abb. 18). Daher erfolgte anschließend eine qPCR zum quantitativen Nachweis von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-GATA-3-Vektor. Auch hier dienten cDNA aus Hut-78-Zellen als Positivkontrolle, unbehandelte Zellen und Wasser als Negativkontrollen. Als Kontrolle für eine generelle Expression wurde das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet (nicht abgebildet). Der Nachweis von GATA-3 gelang ebenso wenig wie in der qualitativen PCR (s. Abb. 19).

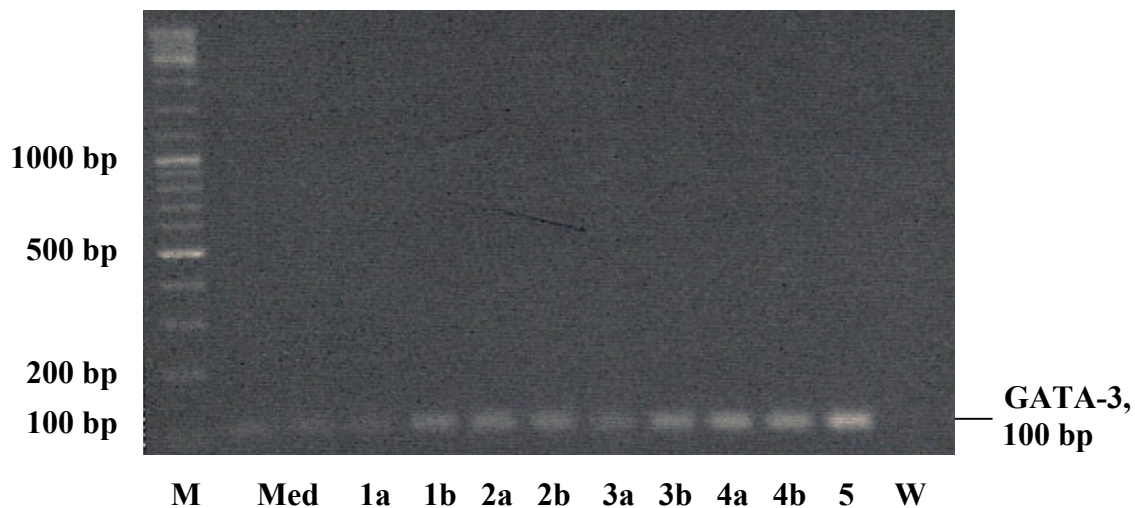


Abb. 18 Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels RT-PCR (dargestellt für die Transfektionsreagenzien LT1 und PEI). Die HEK-293-Zellen wurden in einer Doppelbestimmung (a+b) mittels LT1 mit dem mCherry-Vektor (1) oder dem mCherry-GATA-3-Vektor (2) transfiziert. Zum Vergleich wurde eine Transfektion des mCherry-Vektors (3) oder des mCherry-GATA-3-Vektors (4) mittels PEI durchgeführt. Nach RNA-Aufreinigung und reverser Transkription erfolgten eine GATA-3-PCR und Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Hierbei wurde cDNA aus Hut-78-Zellen als Positivkontrolle eingesetzt (5). Die GATA-3-Primer waren so konzipiert, dass das resultierende Fragment eine Länge von 100 bp aufwies. Als Negativkontrollen dienten nur mit Nährmedium behandelte Zellen (Med) und Wasser (W). Bei M handelt es sich um den Marker.

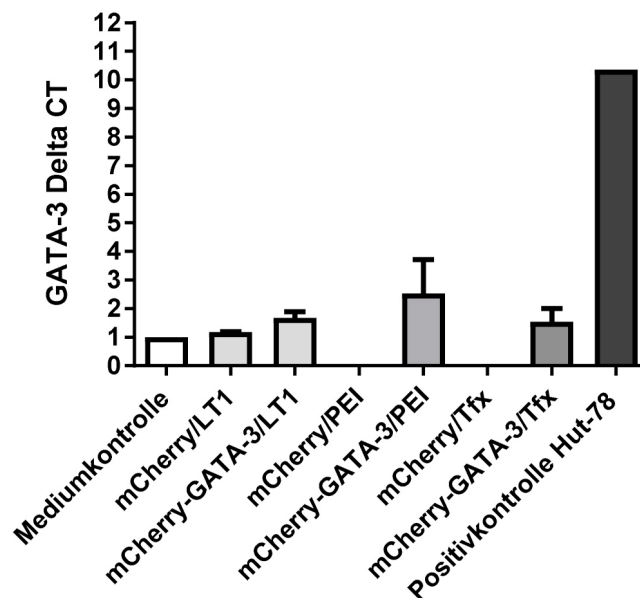


Abb. 19 Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels qRT-PCR (dargestellt für die Transfektionsreagenzien LT1, PEI, Tfx). Die HEK-293-Zellen wurden unter Zuhilfenahme der Transfektionsreagenzien LT1, PEI und Tfx mit dem mCherry-Vektor oder dem mCherry-GATA-3-Vektor transfiziert. Mit der aus den Zellen aufgereinigten RNA erfolgte nach reverser Transkription eine qPCR unter Einsatz von GATA-3-Primern. Als Positivkontrolle diente cDNA aus Hut-78-Zellen, die GATA-3 exprimieren. Die Expression von GATA-3 ist als Mittelwert zweier Transfektionsansätze und in Bezug auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH (ausgedrückt als Delta CT) dargestellt. Der Wert für die Mediumkontrolle wurde aus Gründen der Übersicht auf 1 gesetzt.

4.2.2 Nachweis einer erfolgreichen Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor

Da der psiCheck-Vektor Genabschnitte enthält, die für Luciferasen kodieren, wurde hier als Nachweisverfahren primär die Lumineszenzspektroskopie eingesetzt. Der Umsatz eines spezifischen Substrats durch die Firefly- bzw. Renilla-Luciferase konnte quantitativ dargestellt werden. Bei Firefly handelt es sich um eine konstitutive Luciferase, die Renilla-Luciferase ist klonierungsabhängig. Die Suppression der Genexpression nach Behandlung mit dem DNazym konnte durch Bildung des Quotienten aus der Aktivität der beiden Luciferasen analysiert werden.

Nachdem zur Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem mCherry-GATA-3-Vektor bereits unterschiedliche lipophile Transfektionsreagenzien ausgetestet worden waren, sollte dies auch zur Transfektion des psiCheck-GATA-3-Vektors geschehen. LT1 und Tfx hatten bezüglich des mCherry-GATA-3-Vektors unterschiedlich hohe Transfektionsraten gezeigt. Beide Reagenzien wurden nun auch zur Transfektion von psiCheck-GATA-3 gemäß dem unter 3.4.3.1 geschilderten Protokoll genutzt. Neu wurde DharmaFECT ausgetestet, das allerdings aufgrund kaum nachweisbarer Transfektion sofort wieder ausgeschlossen wurde. Ebenfalls zum ersten Mal wurde Escort/Chloroquine benutzt; das entsprechende Transfektionsprotokoll ist unter 3.4.3.2 beschrieben.

Die HEK-293-Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit Hilfe der Transfektionsreagenzien mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfiziert und nach weiteren 48 Stunden mittels Lumineszenzspektroskopie (s. 3.5.4) untersucht.

Ein zweiter Ansatz sah eine zusätzliche Behandlung mit den Transfektionsreagenzien vor. Da im Verlauf eine weitere Transfektion (Expressionsvektor und DNazym) geplant war, sollten vorab auf diese Weise negative Effekte wie eine möglicherweise erhöhte Toxizität durch die wiederholte Einwirkung der Substanzen auf die Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor erneut nur mit den jeweiligen Transfektionsreagenzien behandelt. Die Analyse erfolgte 24 Stunden später zusammen mit den ausschließlich mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfizierten Zellen. Als Negativkontrolle dienten in beiden Fällen HEK-293-Zellen, die nur mit Nährmedium versetzt waren. In Abb. 20 ist das Ergebnis der Lumineszenzspektroskopie dargestellt. Der Einfachheit halber ist nur die Lumineszenzmessung der Firefly-Luciferase gezeigt, für die Renilla-Luciferase verhält sich das Ergebnis analog (s. Abb. 20).

4. Ergebnisse

Letztlich zeigte sich die höchste Effizienz für die Transfektion des psiCheck-GATA-3-Vektors bei der Verwendung von LT1, wie auch schon bezüglich des mCherry-GATA-3-Vektors gezeigt werden konnte. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit den Transfektionsreagenzien führte jedoch, vermutlich bedingt durch eine erhöhte toxische Wirkung auf die Zellen, eher zu einer Verminderung der Lumineszenz. Entsprechend wurden weiterführende Untersuchungen zur Zellvitalität nach Doppeltransfektion angeschlossen, die unter 4.3.1 beschrieben sind.

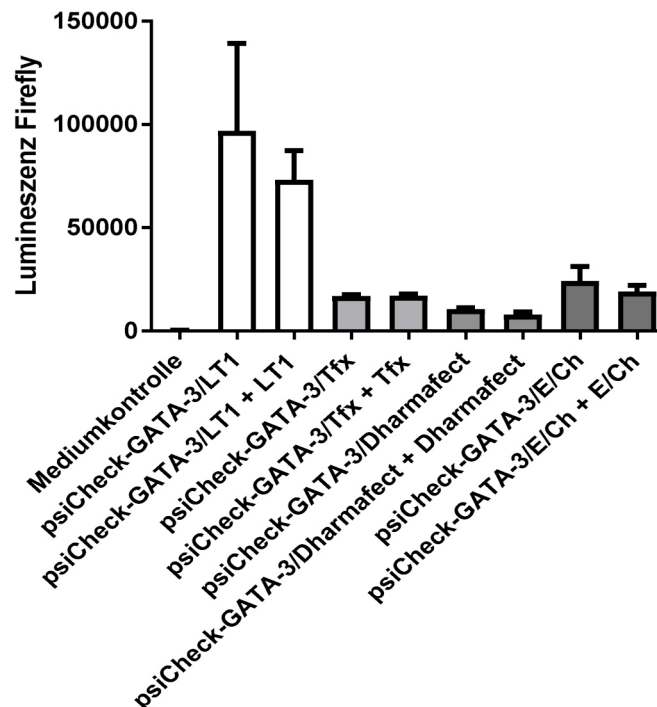


Abb. 20 Analyse der Firefly-Luciferase-Aktivität in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und verschiedenen Transfektionsreagenzien im Vergleich mittels Lumineszenzspektroskopie. Die HEK-293-Zellen wurden zunächst mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor mittels LT1, Tfx, Dharmafect oder Escort/Chloroquine (E/Ch) transfiziert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen 24 h später nochmals mit den Transfektionsreagenzien behandelt (als + *jeweiliges Transfektionsreagenz* abgebildet). Weitere 24 Stunden später erfolgte die Messung der Lumineszenz durch die Firefly- und die Renilla-Luciferase. Aus Gründen der Übersicht sind nur die Ergebnisse für die Firefly-Luciferase dargestellt. Als Negativkontrolle dienten nur mit Nährmedium behandelte Zellen. Die höchste Transfektionseffizienz zeigte sich für LT1. Eine zusätzliche Behandlung mit den Transfektionsreagenzien führte zur Verminderung der Lumineszenz.

Nach Entscheidung für das Transfektionsreagenz LT1 sollte eine Expressionskinetik für den psiCheck-GATA-3-Vektor erstellt werden, um den optimalen Zeitpunkt für eine Behandlung der Zellen mit hgd40 zu bestimmen. Dies sollte auf Proteinebene mittels Lumineszenzspektroskopie und auf RNA-Ebene mittels GATA-3-RT-PCR erfolgen.

Dazu wurden die HEK-293-Zellen in einer 96-well-Platte für die Lumineszenzspektroskopie und in einer 24-well-Platte für die RNA-Isolation ausgesät. Die Ansätze für eine Messung nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden wurden dabei

jeweils als Doppelbestimmung angelegt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit Nährmedium behandelt waren und solche, denen bei Transfektion nur LT1 ohne Plasmid zugegeben wurde. Die Transfektion erfolgte für alle Ansätze 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen. Die HEK-293-Zellen wurden je nach Ansatz 24 bis 144 Stunden nach Transfektion geerntet und zunächst bei -80°C eingefroren, um sie am Ende gemeinsam untersuchen zu können.

Die Lumineszenzspektroskopie zeigte ein Expressionsmaximum der Luciferasen 48 Stunden nach Transfektion (s. Abb. 21). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist lediglich die Messung der Lumineszenz durch die Firefly-Luciferase abgebildet, für die Renilla-Luciferase verhält sich das Ergebnis analog.

Für die Analyse der Genexpression mittels GATA-3-RT-PCR musste zunächst eine RNA-Aufreinigung aus den HEK-293-Zellen durchgeführt werden. Nach anschließender reverser Transkription erfolgte die GATA-3-PCR. Für GATA-3 sollten Banden von 100 bp Länge resultieren. Als Negativkontrolle in der Gelelektrophorese wurde zusätzlich zu den bereits bei der Transfektion angesetzten Nährmedium- und LT1-Kontrollen Wasser verwendet. Im Gegensatz zur GATA-3-PCR für den mCherry-GATA-3-Vektor war bezüglich des psiCheck-GATA-3-Vektors ein Nachweis der GATA-3-Sequenz möglich (s. Abb. 22).

Da in der qualitativen PCR lediglich der Nachweis einer generellen GATA-3-Expression möglich ist, die Expressionskinetik aber nicht beurteilt werden kann, wurde zur quantitativen Analyse anschließend eine qRT-PCR mit denselben Proben durchgeführt. Hier zeigte sich bereits nach 24 Stunden eine hohe Expression. Diese ist nachvollziehbar, da das Maximum der RNA-Expression durch die Abfolge von Transkription und Translation vor dem der Proteinexpression zu erwarten ist. Allerdings fand sich das Expressionsmaximum auch bei dieser Untersuchung 48 Stunden nach Transfektion. Anschließend zeigte sich im Gegensatz zu den Luciferasen eine anhaltende Expression der GATA-3 RNA (s. Abb. 23). Als Housekeeping-Gen diente sowohl für die RT-PCR als auch für die qRT-PCR GAPDH (Gelbild und qPCR nicht dargestellt).

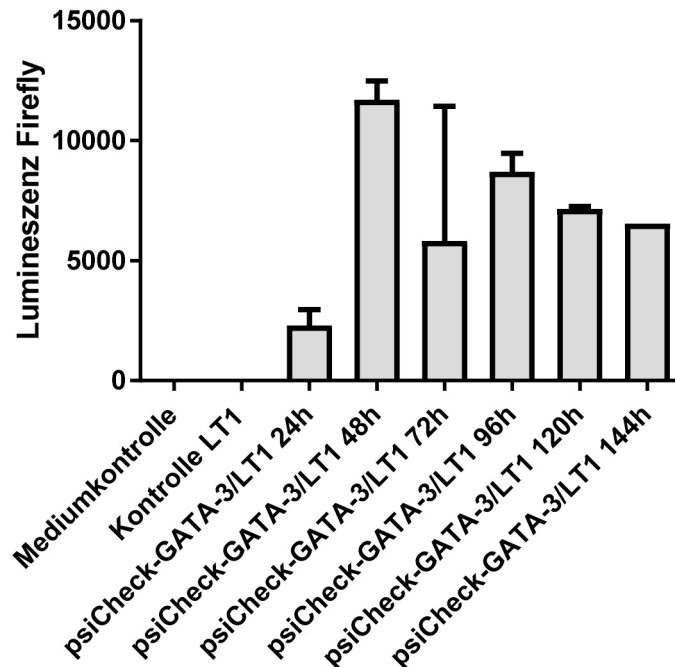


Abb. 21 Analyse der Kinetik der Firefly-Luciferase-Aktivität in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und LT1 mittels Lumineszenzspektroskopie

Die HEK-293-Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit Hilfe des Transfektionsreagens LT1 mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfiziert. Die Lumineszenz der Firefly- und Renilla-Luciferase wurde je nach Ansatz 12, 48, 72, 98, 120 oder 144 Stunden nach der Transfektion gemessen. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz nur mit Nährmedium, ein anderer nur mit dem Transfektionsreagenz LT1 behandelt. Abgebildet ist die Lumineszenz der Firefly-Luciferase als Mittelwert zweier Transfektionsansätze. Für die Renilla-Luciferase verhält sich das Ergebnis analog.

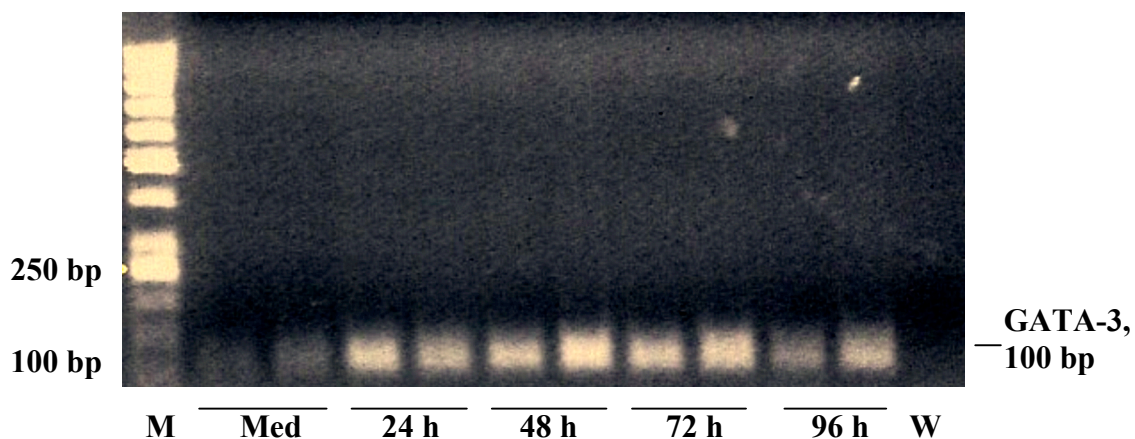


Abb. 22 Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und LT1 mittels RT-PCR

Die HEK-293-Zellen wurden in einer Doppelbestimmung 24 Stunden nach Aussaat mit Hilfe des Transfektionsreagens LT1 mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfiziert. Je nach Ansatz erfolgte 24, 48, 72 oder 96 Stunden später die Aufreinigung der RNA. Nachfolgend wurden eine reverse Transkription und GATA-3-PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Die GATA-3-Primer waren so konzipiert, dass das resultierende Fragment eine Länge von 100 bp aufwies. Als Negativkontrollen dienten nur mit Nährmedium behandelte Zellen (Med) und Wasser (W). Bei M handelt es sich um den Marker.

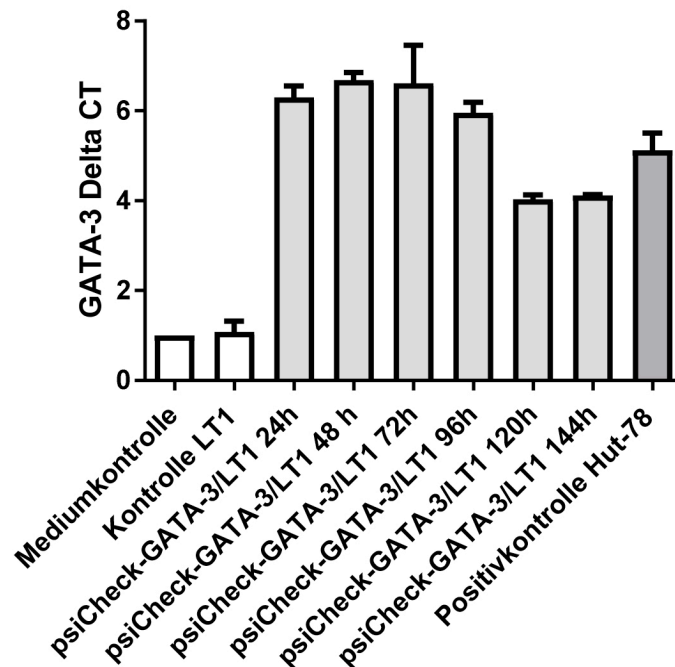


Abb. 23 Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und LT1 mittels qRT-PCR

Die HEK-293-Zellen wurden 24 Stunden nach Aussaat mit Hilfe des Transfektionsreagenz LT1 mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfiziert. Je nach Ansatz erfolgte 24, 48, 72, 96 oder 144 Stunden später die Aufreinigung der RNA. Anschließend wurden eine reverse Transkription und GATA-3-qPCR durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten nur mit Nährmedium oder dem Transfektionsreagenz LT1 behandelte Zellen, zur Positivkontrolle wurde cDNA aus GATA-3 exprimierenden Hut-78-Zellen eingesetzt. Die Expression von GATA-3 ist als Mittelwert zweier Transfektionsansätze und in Bezug auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH (ausgedrückt als Delta CT) dargestellt. Der Wert für die Mediumkontrolle wurde aus Gründen der Übersicht auf 1 gesetzt.

4.3 Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem DNazym hgd40

Die Expressionsvektoren enthalten Gensequenzen mit Schnittstellen für das DNazym hgd40. Dieses wurde dementsprechend in einer zusätzlichen Transfektion in die Zellen eingebracht. Zunächst wurde dazu erneut das lipophile Transfektionsreagenz LT1 nach demselben Protokoll wie zur Transfektion der Zellen mit den Expressionsvektoren verwendet. Später wurde zur Steigerung der Transfektionseffizienz das lipophile Transfektionssystem Escort/Chloroquine eingesetzt. Die Durchführung dieser Transfektion ist unter 3.4.3.2 beschrieben. Wichtig ist, dass der Transfektionskomplex nach 3-4 Stunden entfernt und durch frisches Nährmedium ersetzt wird, um die Zytotoxizität von Chloroquine zu mindern. Um eine sichere Aufnahme des DNazyms in die Zellen zu gewährleisten, wurde eine doppelte Transfektion mit einem Zeitabstand von 12 Stunden zwischen beiden DNazym-Transfektionen vorgenommen. Als Negativkontrolle diente das Kontroll-DNazym ODNg, das eine katalytische Domäne, aber keine spezifischen Bindungssequenzen für GATA-3 mRNA besitzt.

4.3.1 Analyse der Zellvitalität nach Doppeltransfektion

Werden Zellen mehrfach transfiziert, so wie in diesem Falle mit dem Expressionsvektor und dem DNazym, sind toxische Wirkungen nicht auszuschließen. Mit Hilfe des kolorimetrischen Nachweisverfahrens CellTiter 96[®] Aqueous One Cell Solution Cell Proliferation Assay der Firma Promega sollte daher zunächst die Toxizität der Transfektionsreagenzien nach mehrfacher Transfektion mit dem Expressionsvektor und dem DNazym untersucht werden. Dabei wird aus einem nicht-farbigem Substrat durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen das farbige wasserlösliche Produkt Formazan gebildet, das photometrisch erfasst werden kann. Die gemessene Absorption (Maximum bei 490 nm) korreliert gut mit der Stoffwechselaktivität und damit mit der Vitalität der Zellen.

Initial war LT1 nicht nur für die Transfektion des Vektors, sondern auch für die von hgd40 als Transfektionsreagenz verwendet worden, sodass eine Vitalitätsmessung nach Doppeltransfektion mit LT1 durchgeführt wurde. Die HEK-293-Zellen wurden in einer 96-well-Platte ausgesät und 24 Stunden später mittels LT1 mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfiziert. Ausgespart wurden dabei die Ansätze für die Negativkontrollen, die nur mit Nährmedium behandelt wurden. Dann wurden unterschiedliche Mengen von hgd40 mit LT1 versetzt und 12 bzw. 24 Stunden nach der Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor ebenfalls zu den Zellen gegeben. Ein Ansatz wurde zur Kontrolle mit ODNg und LT1 behandelt, einem weiteren wurde 12 Stunden nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor nur noch einmal LT1 zugegeben. Am Folgetag erfolgte dann die Messung der Vitalität der Zellen (s. 3.4.4).

Für die Ansätze, die 12 Stunden nach Transfektion mit dem Vektor mit hgd40 transfiziert worden waren, ergaben sich nahezu identische Ergebnisse wie für jene, die nach 24 Stunden mit hgd40 behandelt worden waren. Zur besseren Übersicht ist daher in Abb. 24 nur das Ergebnis der Behandlung nach 12 Stunden dargestellt (s. Abb. 24). In beiden Fällen zeigten die HEK-293-Zellen eine hohe Vitalität.

Im Verlauf wurde LT1 für die Transfektion mit dem DNazym gegen Escort/Chloroquine ausgetauscht. Entsprechend erfolgte eine erneute Vitalitätsmessung, um auch bei diesen Substanzen eine mögliche toxische Wirkung auf die Zellen zu untersuchen. Die HEK-293-Zellen wurden in einer 96-well-Platte ausgesät. Von drei Ansätzen (jeweils Doppelbestimmung) wurde der erste nur mit Nährmedium behandelt. Die beiden anderen wurden 24 Stunden später mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und LT1 transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurde einer dieser Ansätze nur mit

4. Ergebnisse

Escort/Chloroquine ohne DNazym versetzt, der zweite wurde mittels Escort/Chloroquine und hgd40 transfiziert. Dieses Vorgehen wurde 12 Stunden später noch einmal wiederholt, um die Vitalität nach einer Doppeltransfektion mit dem DNazym untersuchen zu können. 12 Stunden nach der 2. Transfektion mit hgd40 erfolgte die Vitalitätsmessung.

Die ausschließlich mit LT1 transfizierten Zellen hatten eine hohe Vitalität gezeigt (s. Abb. 24). Wurde hingegen nach Plasmidtransfektion mit LT1 zur Transfektion von hgd40 Escort/Chloroquine eingesetzt, war ein höherer Verlust an vitalen Zellen nachweisbar (s. Abb. 25). Die Kontrolle, die nach Plasmidtransfektion mittels LT1 mit einem Ansatz aus Escort/Chloroquine ohne hgd40 versetzt wurde, zeigte eine ähnlich hohe Vitalitätsrate wie die unbehandelten Zellen (Mediumkontrolle). Zu erklären ist dies am ehesten über den größeren Komplex, der aus hgd40 mit den Transfektionsreagenzien entsteht und nach endozytotischer Aufnahme eher toxische Wirkungen in den Zellen verursachen kann (s. 5.2.2).

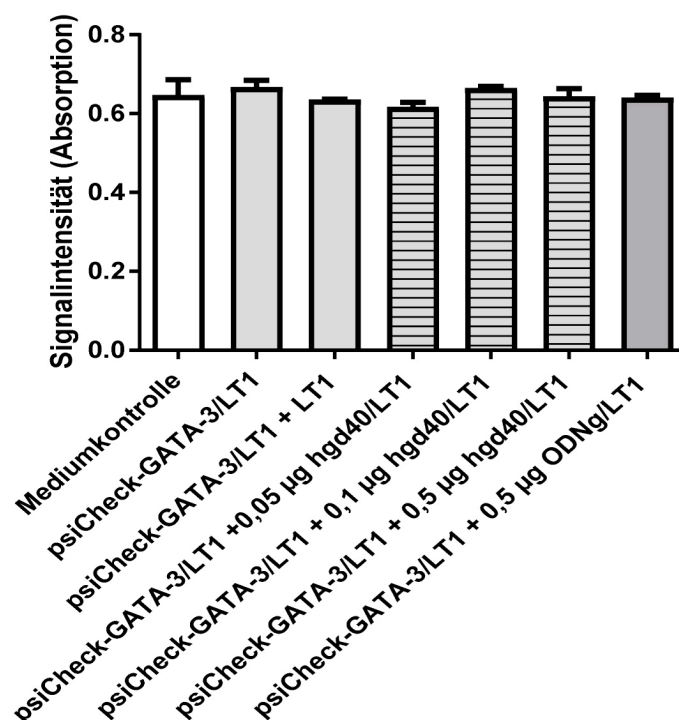


Abb. 24 Analyse der Vitalität der HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und hgd40 bzw. ODNg mittels LT1

Nachweis mit Hilfe des kolorimetrischen Nachweisverfahrens CellTiter 96® Aqueous One Cell Solution Cell Proliferation Assay. Die HEK-293-Zellen wurden mittels LT1 mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfiziert. 12 Stunden später wurden die Zellen erneut behandelt. Einem Ansatz wurde nochmals LT1 zugegeben, weitere Ansätze wurden mittels LT1 und unterschiedlichen Mengen hgd40 bzw. ODNg zur Kontrolle transfiziert. Als Negativkontrolle dienten nur mit Nährmedium behandelte Zellen. Weitere 24 Stunden später erfolgte die Messung der Vitalität, die in allen Ansätzen ähnlich hoch war.

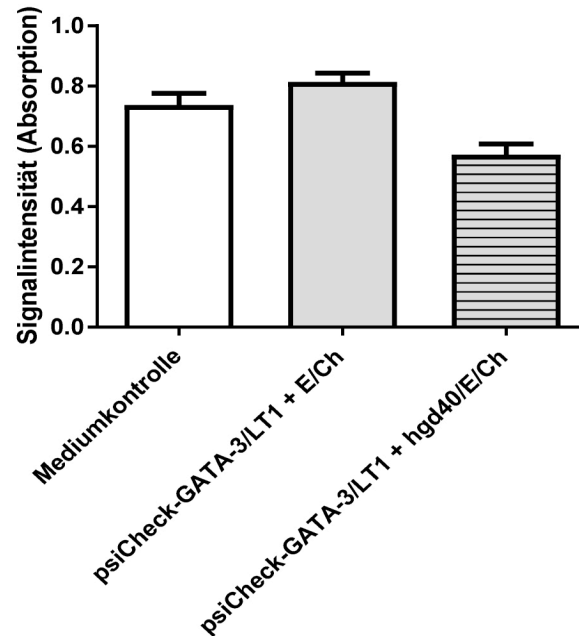


Abb. 25 Analyse der Vitalität der HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor mittels LT1 und hgd40 mittels Escort/Chloroquine (E/Ch)

Nachweis mit Hilfe des kolorimetrischen Nachweisverfahrens CellTiter 96® Aqueous One Cell Solution Cell Proliferation Assay. Die HEK-293-Zellen wurden mittels LT1 mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor transfiziert. Ein Ansatz wurde 12 und 24 Stunden später nur mit Escort/Chloroquine ohne hgd40 versetzt, ein weiterer mittels Escort/Chloroquine und hgd40 transfiziert. Als Negativkontrolle dienten nur mit Nährmedium behandelte Zellen. Weitere 12 Stunden später erfolgte die Vitalitätsmessung. Eine Transfektion mit Escort/Chloroquine und hgd40 reduziert die Zellvitalität deutlich.

4.3.2 Nachweis einer effizienten Transfektion des DNAzyms

Neben einer ausreichenden Überlebensrate der Zellen ist der Nachweis einer suffizienten Transfektion von DNAzym mittels Escort/Chloroquine von Bedeutung. Dies erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS).

Dazu wurde ein mit fluoreszierendem FAM markiertes hgd40-DNAzym verwendet, das mittels Escort/Chloroquine in HEK-293-Zellen transfiziert wurde. Als Negativkontrolle dienten zum einen Zellen, die nur in Nährmedium vorlagen, zum anderen solche, die durch Transfektion mittels LT1 den psiCheck-GATA-3-Vektor enthielten und anschließend nur mit dem Gemisch aus Escort/Chloroquine behandelt wurden, ohne dass darin FAMhgd40 enthalten war. Ein weiterer Ansatz wurde nur mit dem FAM-markierten DNAzym ohne vorherige Bildung eines Transfektionskomplexes mit Escort/Chloroquine behandelt, um Signale zu erfassen, die durch Anregung des Komplexes ohne Aufnahme in die Zelle zustande kommen.

Die Transfektion der HEK-293-Zellen mit psiCheck-GATA-3 und LT1 erfolgte 24 Stunden nach Aussaat in einer 24-well-Platte. Am Folgetag wurde einer der Ansätze, die den Vektor enthielten, nur mit Escort/Chloroquine ohne zusätzliche DNA versetzt, ein weiterer nur mit FAMhgd40 ohne Transfektionsreagenz. Der dritte Ansatz wurde

4. Ergebnisse

schließlich gemäß Protokoll mit FAMhgd40 und Escort/Chloroquine transfiziert. Zusätzlich existierte eine Mediumkontrolle, bei der stets nur ein Wechsel des Nährmediums durchgeführt wurde. 24 Stunden nach der Transfektion mit FAMhgd40 bzw. entsprechender Behandlung der Kontrollen wurde die FACS-Messung durchgeführt. Es zeigte sich eine erfolgreiche Aufnahme des FAM-markierten hgd40 mittels Escort/Chloroquine in mehr als der Hälfte der vitalen Zellen. Dargestellt sind jeweils als Population M1 die Zellen ohne messbare Fluoreszenz, während im FITC-A-Kanal als Population M2 die Zellen detektiert wurden, die durch die Aufnahme von FAMhgd40 fluoreszieren (s. Abb.27). Zum besseren Vergleich sind die Ergebnisse in Abb. 26 graphisch dargestellt (s. Abb. 26).

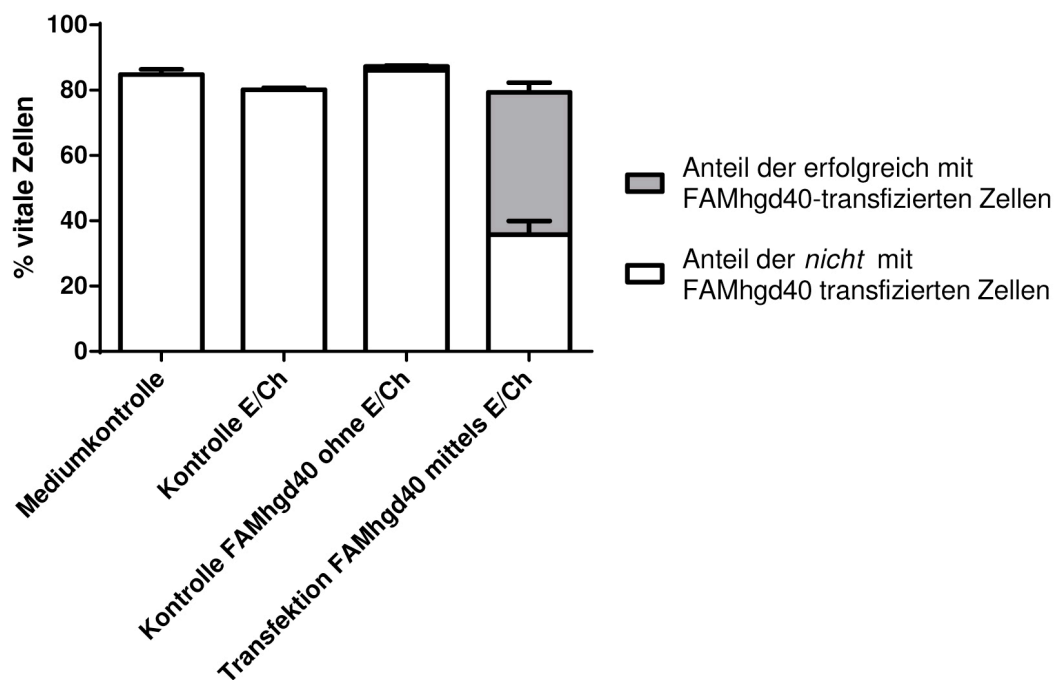


Abb. 26 Graphische Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse von Zellvitalität und Transfektionseffizienz nach Behandlung der HEK-293-Zellen mit FAMhgd40 und Escort/Chloroquine (E/Ch)

Die Behandlung der HEK-293-Zellen erfolgte 24 Stunden nach Aussaat. Dargestellt sind neben der Transfektion der Zellen mit FAMhgd40 mittels E/Ch die Kontrollen, in denen die Zellen nur mit dem DNazym *oder* E/Ch behandelt wurden. Die Höhe der Balken zeigt den prozentualen Anteil der vitalen Zellen. Bezüglich der mit FAMhgd40 und E/Ch behandelten Zellen gibt der grau schraffierte Bereich den Anteil der erfolgreich transfizierten fluoreszierenden Zellen wieder.

4. Ergebnisse

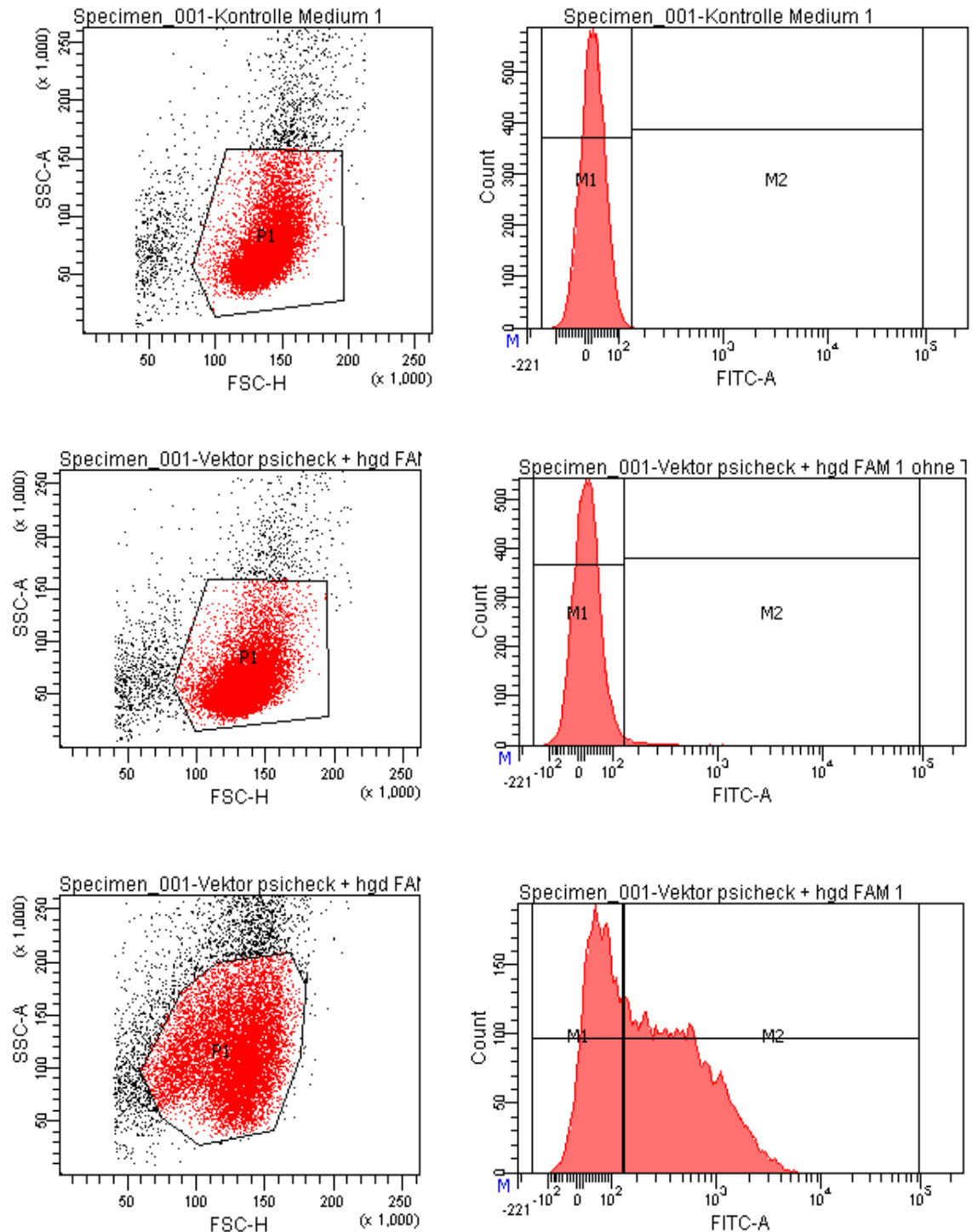


Abb. 27 FACS-Analyse (Dot Blots und Histogramme) von Zellvitalität und Transfektionseffizienz nach Behandlung der HEK-293-Zellen mit FAMhgd40 und Escort/Chloroquine (E/Ch)

Im linken Bild wurde jeweils die vitale Zellpopulation aufgrund von Zellgröße und -granularität abgegrenzt. Das rechte Bild gibt die Fluoreszenz der Zellen wieder. Nur, wenn diese vorhanden ist, werden Zellen im FITC-A-Kanal detektiert und im entsprechenden Fenster M2 der Graphik abgebildet. Das Fenster M1 entspricht den nicht fluoreszierenden Zellen. Die oberste Bildreihe zeigt die Mediumkontrolle, in der mittleren Bildreihe wurde nur mit FAMhgd40 ohne Transfektionsreagenzien behandelt und die untere Bildreihe zeigt die mit Escort/Chloroquine und FAMhgd40 transfizierten Zellen.

4.4 Suppression der Genexpression durch Behandlung mit hgd40

Nachdem eine Transfektion der HEK-293-Zellen mit dem mCherry-GATA-3-Vektor bzw. mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor erfolgreich durchgeführt worden war, wurden die Zellen im nächsten Schritt mit hgd40 transfiziert. Das GATA-3-spezifische DNase sollte die GATA-3 mRNA spalten und somit die Genexpression des Vektors supprimieren. Da primär Systeme entwickelt werden sollten, die einfach in der Praxis anwendbar sind, sollte der Nachweis zunächst auf Proteinebene über Messung des jeweiligen Signals erfolgen. Es müsste also eine verminderte Fluoreszenz der Zellen mit dem mCherry-GATA-3-Vektor bzw. eine reduzierte Lumineszenz der mit psiCheck-GATA-3-Vektor transfizierten Zellen nachweisbar sein. Zusätzlich wurde die Analyse der Expression im Verlauf auf die Ebene der RNA ausgeweitet.

4.4.1 Suppression der Genexpression des mCherry-GATA-3-Vektors durch die Behandlung mit hgd40

Nach Transfektion mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels LT1 wurden die HEK-293-Zellen mit Hilfe von Escort/Chloroquine mit hgd40 transfiziert. Es gelang in keinem der unter 4.2.1 dargestellten Nachweisverfahren (Konfokalmikroskopie, RT-PCR und qRT-PCR), eine verminderte Expression des mCherry-Proteins oder von GATA-3 nach Behandlung der transfizierten Zellen mit dem DNase zu zeigen (nicht dargestellt).

Zum einen war bereits der qualitative Nachweis des mCherry-Proteins vor Behandlung mit hgd40 in der Analyse durch die konfokale Lasermikroskopie sehr gering. Zum anderen stellen weitere Faktoren mögliche Gründe für die fehlende Suppression dar und werden unter 5.4.1 und 5.5 diskutiert.

4.4.2 Suppression der Genexpression des psiCheck-GATA-3-Vektors durch die Behandlung mit hgd40

In der Untersuchung der Expressionskinetik hatte sich gezeigt, dass die Luciferasen nach 48 Stunden maximal exprimiert werden. Bezüglich der RNA hatte eine hohe Expression bereits nach 24 Stunden und anschließend dauerhaft bestanden.

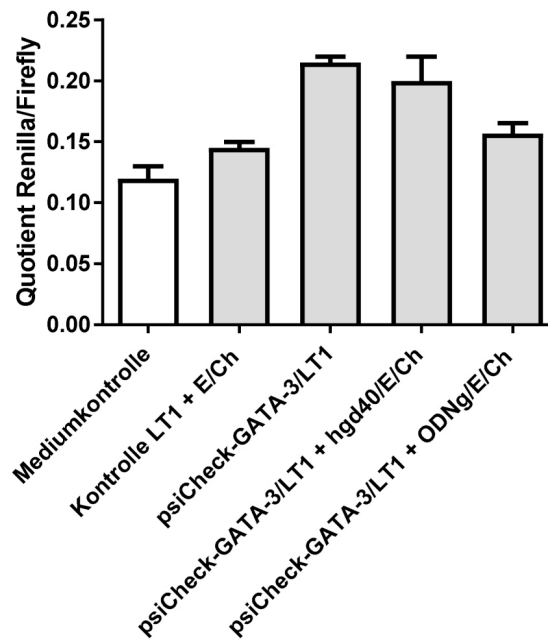
Zur Suppression der Genexpression durch Behandlung der HEK-293-Zellen mit hgd40 wurden zwei Ansätze untersucht. Im ersten Ansatz sollte in den Anstieg der Genexpression eingegriffen werden, der zweite Ansatz sah eine Einflussnahme im Abfall der Expression nach dem Maximum von 48 Stunden vor.

Die Zellen wurden für die spätere Messung der Lumineszenz in einer weißen 96-well-Platte und für die RNA-Aufreinigung zur Analyse mittels qRT-PCR in einer 48-well-Platte ausgesät. Beide Versuchsansätze beinhalteten eine Transfektion der Zellen mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor mittels LT1 24 Stunden nach der Aussaat. Für den ersten Versuchsansatz, bei dem in den Anstieg der Expression eingegriffen werden sollte, erfolgte eine Doppeltransfektion mit hgd40 und Escort/Chloroquine nach weiteren 12 Stunden und nochmals nach 24 Stunden. In einem zweiten Versuchsprotokoll wurde mittels Doppeltransfektion von hgd40 in den Abfall der Expression nach dem Maximum von 48 Stunden eingegriffen. Die Transfektion erfolgte zwar nach dem gleichen Prinzip, aber in anderen Zeitabständen als beim ersten Versuch zur Suppression durch hgd40. In diesem Ansatz wurden die HEK-293-Zellen 60 und 72 Stunden nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor mit hgd40 transfiziert. Eine Analyse der Suppression erfolgte für beide Versuchsansätze 12, 24 und 36 Stunden nach der 2. Transfektion von hgd40.

Die Proteinexpression wurde mit Hilfe der Lumineszenzspektroskopie erfasst. Die Signalintensitäten der Firefly-Luciferase (konstitutionell) und der Renilla-Luciferase (klonierungsabhängig) wurden zur Auswertung durch einen Quotienten (Renilla/Firefly) ausgedrückt, der bei einer erfolgreichen Suppression geringer werden müsste. Zur Analyse der Suppression auf RNA-Ebene wurde die quantitative RT-PCR eingesetzt. Nach RNA-Aufreinigung wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Anschließend erfolgte die qPCR unter Verwendung von GATA-3-Primern. GAPDH diente als Housekeeping-Gen (nicht dargestellt). Sowohl für die Lumineszenzspektroskopie als auch für die qRT-PCR ist aus Gründen der Übersichtlichkeit exemplarisch nur die Auswertung der Messung nach jeweils 12 Stunden dargestellt. Für die Messung nach 24 und 36 Stunden verhielten sich die Ergebnisse ähnlich.

In beiden Versuchsansätzen decken sich die Ergebnisse der Lumineszenzmessung mit der Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR. Weder eine Behandlung der HEK-293-Zellen mit hgd40 12 und 24 Stunden nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor (s. Abb. 28), noch 60 und 72 Stunden danach (s. Abb. 29) führt zu einer Suppression der Lumineszenz oder der Genexpression von GATA-3.

A



B

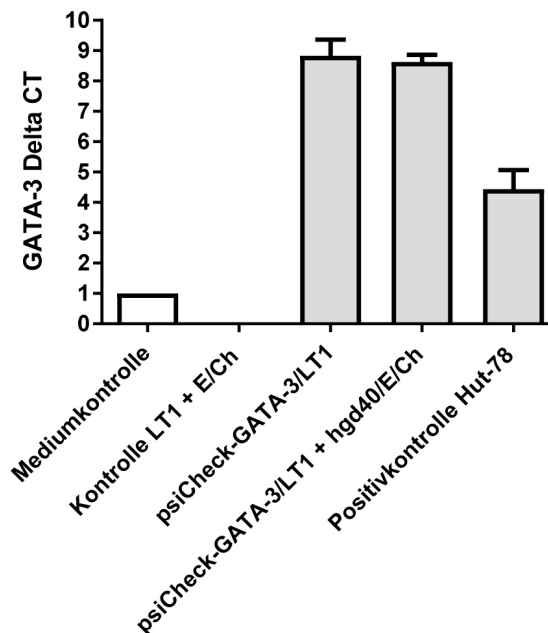
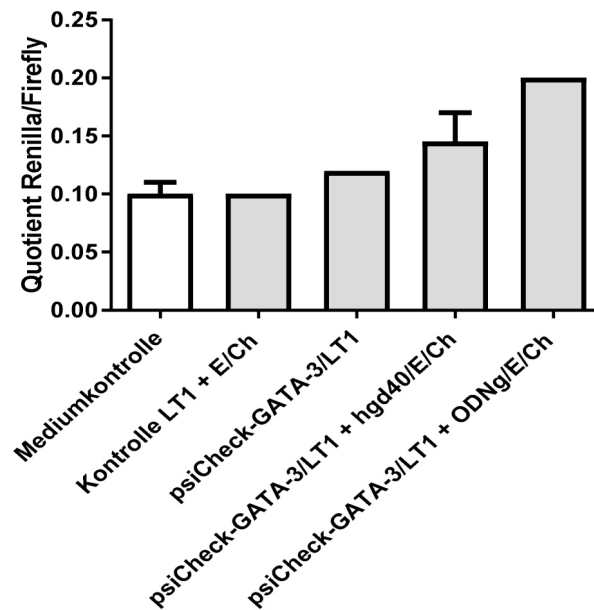


Abb. 28 Analyse der Luciferase-Aktivität mittels Lumineszenzspektroskopie und der Expression von GATA-3 mittels qRT-PCR in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und Behandlung mit hgd40 vor dem Expressionsmaximum

Die Transfektion der HEK-293-Zellen mit hgd40 erfolgte mittels Escort/Chloroquine (E/Ch) 12 und 24 h nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor mittels LT1. Dargestellt ist unter **A** der Quotient aus den Ergebnissen der Aktivitätsmessung der Renilla- und Firefly-Luciferase mittels **Lumineszenzspektroskopie** 12 h nach der 2. Transfektion mit hgd40. Bei ODNg handelt es sich um ein unspezifisches Kontroll-DNAzym. Ein verminderter Quotient würde eine erfolgreiche Suppression der Renilla-Luciferase durch das DNAzym anzeigen. Unter **B** ist die Analyse der Expression von GATA-3 mittels **qRT-PCR** 12 h nach der 2. Transfektion mit hgd40 abgebildet. Diese ist als Mittelwert zweier Transfektionsansätze und in Bezug auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH (ausgedrückt als Delta CT) dargestellt. Der Wert für die Mediumkontrolle wurde aus Gründen der Übersicht auf 1 gesetzt. Als Positivkontrolle diente cDNA aus GATA-3 exprimierenden Hut-78-Zellen.

A



B

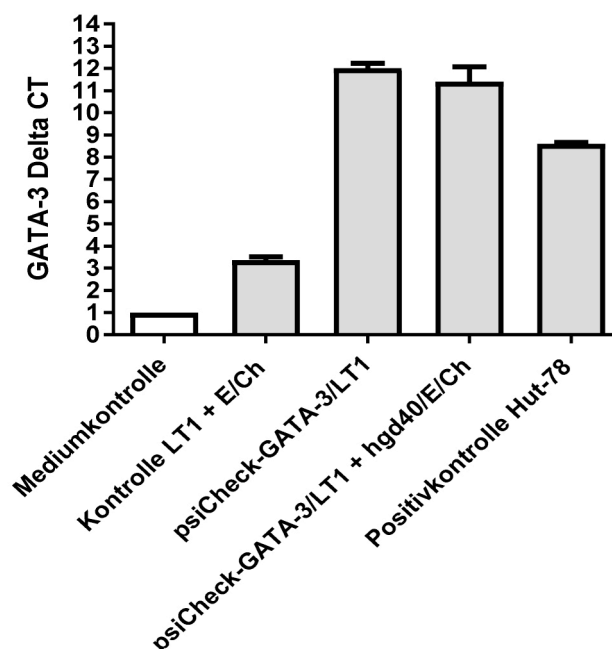


Abb. 29 Analyse der Luciferase-Aktivität mittels Lumineszenzspektroskopie und der Expression von GATA-3 mittels qRT-PCR in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und Behandlung mit hgd40 nach dem Expressionsmaximum

Die Transfektion der HEK-293-Zellen mit hgd40 erfolgte mittels Escort/Chloroquine (E/Ch) 60 und 72h nach der Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor mittels LT1. Dargestellt ist unter **A** der Quotient aus den Ergebnissen der Aktivitätsmessung der Renilla- und Firefly-Luciferase mittels **Lumineszenzspektroskopie** 12 h nach der 2. Transfektion mit hgd40. Bei ODNg handelt es sich um ein unspezifisches Kontroll-DNAzym. Ein verminderter Quotient würde eine erfolgreiche Suppression der Renilla-Luciferase durch das DNAzym anzeigen. Unter **B** ist die Analyse der Expression von GATA-3 mittels **qRT-PCR** 12 h nach der 2. Transfektion mit hgd40 abgebildet. Diese ist als Mittelwert zweier Transfektionsansätze und in Bezug auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH (ausgedrückt als Delta CT) dargestellt. Der Wert für die Mediumkontrolle wurde aus Gründen der Übersicht auf 1 gesetzt. Als Positivkontrolle diente cDNA aus GATA-3 exprimierenden Hut-78-Zellen.

5. Diskussion

Im Pathomechanismus zahlreicher Erkrankungen findet sich die Differenzierung von Zelltypen zu spezifischeren Formen, die mittels Botenstoffen und entsprechender Rezeptoren agieren können. Bei allergischen Erkrankungen, wie dem Asthma bronchiale sind dies die T-Helferzellen, welche über die Ausdifferenzierung zu Th-2-Zellen und Sekretion spezifischer Zytokinen eine Kaskade in Gang setzen können, die letztendlich zur Ausprägung des typischen Krankheitsbildes führt (Akdis, 2006).

Bisher erfolgt die Therapie des Asthma bronchiale rein symptomatisch. Man versucht, die Symptome nach bereits erfolgter Manifestation über den Einsatz von antientzündlich sowie bronchospasmolytisch wirksamen Medikamenten zu lindern. Laut aktuellen Studien stellt nach Ansicht europäischer Fachärzte für die Behandlung von Asthma bronchiale eine Kombination aus inhalativen Corticosteroiden und lang wirksamen β_2 -Sympathomimetika die bislang erfolgversprechendste Therapieoption dar (Bousquet et al., 2012). Bei bestimmten Patientengruppen werden inzwischen ergänzend Präparate wie Leukotrienrezeptorantagonisten und Anti-IgE (Omalizumab) eingesetzt. Sogenannte Zytokin- bzw. Zytokin-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. monoklonale Antikörper gegen die Rezeptoren von IL-4, -5 und -13 oder TNF- α -Antagonisten, zeigten unterschiedliches Therapieansprechen und teilweise schwerwiegende Nebenwirkungen, sodass ihr Einsatz in der Praxis begrenzt ist (s. 1.3.3 und 1.4.1).

Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung chronischer oder maligner Erkrankungen stellen Antisense-Strategien dar. Über den Einsatz der hierzu gehörenden Substanzen soll eine Proteinüberexpression, und damit die Ausbildung eines Krankheitsbildes bereits auf Ebene der Genexpression verhindert werden. In der Onkologie werden entsprechende Präparate bereits eingesetzt (s. 1.4). In den letzten Jahren wurde die Forschung zu diesen Substanzen zunehmend auf das Gebiet der chronischen Erkrankungen, wie das Asthma bronchiale, ausgedehnt. Ziel ist es, die Ausbildung des typischen Zytokinmilieus und damit der Zellkonstellation des Asthma bronchiale bereits auf Ebene der Gentranskription zu inhibieren (Tian et al., 2011; Darcan-Nicolaisen et al., 2009; Sel et al. 2008).

Zur Gruppe der Antisense-Moleküle gehören DNzyme (s. 1.4.3.2). Inzwischen wurden Asthmatiker erfolgreich mit dem DNzym SB010 in einer Phase IIa-Studie behandelt (Krug et al., 2015). Die experimentelle Phase dieser Arbeit wurde allerdings noch vor Einsatz dieses Präparats in klinischen Studien durchgeführt. Um DNzyme

vor einem möglichen Gebrauch *in vivo* austesten zu können, fehlten zu diesem Zeitpunkt noch geeignete Systeme zur *in vitro*-Charakterisierung. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit ein Testsystem entwickelt werden, das eine Suppression der Genexpression über einfach zu analysierende Signale wie Fluoreszenz oder Lumineszenz qualitativ und quantitativ darstellen kann.

5.1 Bisherige Testverfahren zur Analyse der Effizienz von DNAzymen

Die Möglichkeit, eine große Bandbreite an verschiedenen DNAzymen zu generieren, erfordert Nachweissysteme, mit denen es möglich ist, das für die jeweilige Zielstruktur effizienteste DNAzym-Molekül zu finden. Es ist bekannt, dass die effektivste Spaltung der RNA durch DNAzyme im Bereich der Basenabfolgen AU und GU erfolgt (Wang YF et al., 2011). Diese Verbindungen sollten entsprechend innerhalb der spezifischen Zielsequenz vorhanden sein. Um Letztere vorhersagen zu können, wurden verschiedene Computerprogramme generiert, die allerdings bisher keine verlässliche Methode bieten, die passende RNA-Sequenz und damit die DNAzym-Aktivität theoretisch vorherzusagen (Wang YF et al., 2011). Mit Hilfe der Computer-Algorithmen soll die für eine effiziente Interaktion mit dem DNAzym relevante Sekundärstruktur der RNA möglichst exakt beschrieben werden.

Hierzu werden verschiedene strukturelle oder thermodynamische Parameter der RNA in Datenbanken eingeführt, die dann zum Vergleich und Analyse der RNA verwendet werden. Die thermodynamischen Eigenschaften werden beispielsweise mit Hilfe der vorhandenen Formationen innerhalb der RNA wie z.B. Schleifen („loops“) ermittelt. In diesem Zusammenhang ist außerdem das sogenannte „next-nearest-neighbor“-Modell zu nennen. Dieses beschreibt eine Beeinflussung thermodynamischer Eigenschaften von Nukleotidsequenzen durch benachbarte Basenpaare. In einer weiteren Methode werden RNA-Strukturen miteinander verglichen, um möglichst viele Gemeinsamkeiten zu finden und entsprechende Sequenzen zusammen zu gruppieren. Aus den homologen Basenpaarsträngen lassen sich dann einzelne Basenpaaränderungen bestimmen, die Unterschiede in den RNA-Sequenzen bewirken und diese charakterisieren (Krishnan und Simmel, 2011; Gray et al., 2010; Storno, 2006).

Letztlich schwankt die Genauigkeit der Vorhersage der RNA-Struktur jedoch stark und es gibt noch immer viele RNA-Sequenzen mit nur sehr geringer Vorhersehbarkeit (Kierzek et al., 2006). Bis zu 90% der als spezifische Zielstrukturen charakterisierten

RNA-Sequenzen zeigten letztlich keine Reaktion auf die Behandlung mit dem entsprechenden DNAzym (Schubert et al., 2004).

So waren in den letzten Jahren vor Einsatz eines neu generierten DNAzyms noch immer aufwändige *in vitro*-Experimente notwendig. Ähnlich dem Vorgehen von Breaker und Joyce 1994 kann dies auch heute über die recht zeitintensive Analyse der RNA-Degradationsprodukte erfolgen (Breaker und Joyce, 1994). Allerdings ist RNA sehr empfindlich gegenüber ubiquitär vorkommenden RNasen, die in eukaryoten Zellen sowie Bakterien vorkommen. Hier sind sie Teil diverser Mechanismen zur Degradierung von RNA, die als Kontrollmechanismen und Eliminierung fehlerhafter Nukleinsäuren dienen (Houseley und Tollervey, 2009). Die Aktivität der RNasen wiederum ist abhängig von den Umweltbedingungen wie beispielsweise der Temperatur (Silva et al., 2011), sodass letztlich viele verschiedene Faktoren Einfluss auf die RNA haben und deren Analyse erschweren.

DNA ist stabiler als RNA. Inzwischen ist bekannt, dass nicht nur die Watson-Crick-Bindungen der Doppelstränge hierfür verantwortlich sind, sondern noch weitere Interaktionen, wie beispielsweise die zur Ausbildung der Sekundärstruktur führende Hoosteen-Bindung. Durch diese komplexen Interaktionen werden destabilisierende Reaktion, wie Hybridisierung oder Auftrennen der Stränge erschwert (Linak et al., 2011). Aber auch einzelsträngige DNA ist resistenter als RNA, da DNA im Vergleich zur RNA keine Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom C2 besitzt und damit vor Hydrolyse und konsekutiver Lösung der Nukleotidbindungen an dieser Stelle geschützt ist (Leu et al., 2011).

Entsprechend kann nach reverser Transkription der degradierten RNA eine indirekte Analyse der Produkte über die resistendere cDNA durchgeführt werden. Auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte der indirekte Nachweis einer Degradierung der mRNA durch das DNAzym mittels PCR und qPCR der entsprechenden cDNA. Dieses Vorgehen ist allerdings wiederum mit einer Erhöhung des zeitlichen und technischen Aufwands vergesellschaftet. Beide Systeme sind relativ störanfällig, was auch in der vorliegenden Arbeit immer wieder zu Problemen geführt hat. Ein Beispiel ist der Versuch, den im Expressionsvektor vorhandenen Genabschnitt für GATA-3 per PCR zu amplifizieren und im Gelbild darzustellen (s. Abb. 18, Abschnitt 4.2.1). Auch in der Literatur sind erhebliche Einflüsse beschrieben. So können Kontaminationen eine große Rolle spielen (Witt et al., 2009). Es sind sowohl falsch positive, als auch falsch negative Ergebnisse möglich. Letztere können beispielsweise durch

Genpolymorphismen in den untersuchten Abschnitten, die durch die spezifischen Primer nicht erkannt werden können, zustande kommen, wie in anderem Zusammenhang exemplarisch gezeigt werden konnte (Jaton et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Sequenzierung durchgeführt, die zumindest im untersuchten Bereich eine korrekte Basenabfolge ohne Nachweis von Polymorphismen abbildet.

Ein weiteres Problem, gerade bezüglich der noch störanfälligeren qPCR, ist die sehr schwankende Reliabilität der resultierenden Daten sowie eine nicht immer gegebene Reproduzierbarkeit. Dies hängt unter anderem mit der unterschiedlich guten Qualität der aufgereinigten RNA oder davon erstellten cDNA, mit fehlender Standardisierung der Protokolle oder dem hohen subjektiven Einfluss bei der Auswertung der Daten zusammen (Nolan et al., 2006).

Um die Abbauprodukte auf andere Art und Weise sehr spezifisch nachweisen zu können, etablierte Frau Dr. Tanja Dicke in unserer Arbeitsgruppe eine Anionen-Austausch-Chromatographie unter Verwendung einer HPLC.

In vivo, wie beispielsweise im Mausmodell, kann der Erfolg einer RNA-Degradierung durch das DNAzym indirekt anhand der verminderten Proteinexpression, zum Beispiel mittels Zytokin-ELISA gemessen werden. Proteine sind außerdem ähnlich wie DNA deutlich stabiler als RNA. Ähnlich können so genannte MIA (Multiplex immunoassays) Zytokine nachweisen. Jedoch hat sich der klassische Zytokin-ELISA in Studien als verlässlicher erwiesen (Dossus et al., 2009).

Zur Selektion eines effizienten DNAzyms aus einem großen Pool ist ein *in vivo*-Modell jedoch nicht geeignet, sodass vielmehr nach praktikablen *in vitro*-Ansätzen zur Analyse der Effizienz auf Protein-Basis gesucht werden sollte.

5.1.1 Erstellung eines Testverfahrens mittels Reportersystemen

Eine Möglichkeit, die Protein- und damit die Genexpression mittels einfacher Methoden zu quantifizieren, stellt die Verwendung von Reportergenen dar. Diese Gene kodieren für fluoreszierende Proteine oder Luciferasen und sind in Vektoren integriert, sodass sie mittels Transfektion in Zelllinien eingebracht werden können. Das Reportergen kann durch Klonierung mit anderen Genen oder Genfragmenten gekoppelt werden, um anschließend über Messung der Fluoreszenz bzw. der Lumineszenz eine Aussage zur Expression dieses Genabschnitts treffen zu können (Greer und Szalay, 2001).

Als Vertreter fluoreszierender Substanzen ist das Green Fluorescent Protein (GFP) am längsten im Gebrauch und wurde daher im Laufe der Zeit immer wieder modifiziert und optimiert. Da es keinen weiteren Substratzusatz benötigt, um ein Signal zu emittieren, ist es in der Praxis sehr unkompliziert einsetzbar (Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003; Southward und Surette, 2002; Tsien, 1998). In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Versuche durchgeführt, um mit Hilfe eines Reportergensystems, das GFP enthält, ein Testsystem für DNAsyme zu erstellen. Leider war erst ab dem Einsatz einer sehr hohen Menge des Oligonukleotids ein Effekt sichtbar, sodass eine feinere Abstufung des detektierbaren Signals abhängig vom eingesetzten Material nicht möglich war. Das System erwies sich also als ungünstig, was eine Suche nach Alternativen zur Folge hatte.

Hier fiel die Wahl auf den Vektor V.302creIREScherry, der uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sparwasser, Hannover, zur Verfügung gestellt wurde. Es handelt sich bei mCherry um ein rot fluoreszierendes Protein, das sich im Vergleich mit anderen Vertretern dieser Gruppe als besonders stabil gegenüber intrazellulären pH-Veränderungen erwiesen hat und eine ausreichend lange Halbwertszeit aufweist. Außerdem bewegt sich die Emission in einem spezifischen Wellenlängenbereich, sodass sie unter Verwendung spezieller Filter auch dann noch gut abgegrenzt werden kann, wenn mehrere fluoreszierende Signale vorliegen (Shaner et al., 2005).

Beispiele bezüglich eines mit Lumineszenz arbeitenden Reportergensystems sind die Luciferasen Firefly oder Renilla, die auch in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden. Je nach Versuchsaufbau sind die Luciferasen einzeln oder als duales System im Plasmid kodiert enthalten. Die kommerziell erhältlichen dualen Systeme bieten dabei den Vorteil, dass die Analyse der Enzymaktivitäten in einem Ansatz durchgeführt werden kann, da die Reaktion der ersten Luciferase abgestoppt und gleichzeitig die der zweiten aktiviert wird (s. Herstellerangaben Promega Dual-GloTM Luciferase Assay System). Diese Vektorsysteme sind bereits etabliert und bieten mehrere Vorteile wie eine hohe Sensitivität, Kosteneffektivität und unkomplizierte Handhabung (McNabb et al., 2005; Hawkins et al., 2003; Gould und Subramani, 1988). Außerdem benötigen sie zur Aktivierung keinerlei postrtranslationale Modifikation (McNabb et al., 2005). Insgesamt stellen sie somit eine praxistaugliche Methode zur Analyse der Protein- und damit der Genexpression dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte nach Einbringung des entsprechend generierten Expressionsvektors in lebende Zellen eine Behandlung mit dem zugehörigen DNAzym erfolgen. Die dadurch erwartete Gensuppression sollte anschließend über Messung eines verminderten Signals (Fluoreszenz oder Lumineszenz) quantifiziert werden. Es wird deutlich, dass es sich bei der Erstellung eines solchen Testsystems um mehrere Einzelschritte handelt, sodass es an jedem einzelnen zu Hindernissen kommen kann. Letztendlich war bezüglich beider Systeme eine erfolgreiche Transfektion des Expressionsvektors nachweisbar (s. Abschnitt 4.2), während eine entsprechende Suppression der Genexpression durch das DNAzym in keinem der beiden Fälle gezeigt werden konnte (s. Abschnitt 4.4). In den folgenden Abschnitten werden die möglichen Ursachen der Probleme bei der Erstellung der Testsysteme, sowie unternommene Optimierungsversuche und zukünftige mögliche Lösungsansätze erläutert.

5.2 Einbringen von DNA in die Zellen

Der Expressionsvektor, der sowohl das Reportergen als auch das Zielgen für das Test-DNAzym enthält, muss in lebende Zellen eingebracht werden, damit eine Behandlung mit dem DNAzym möglich ist. Dann nämlich kann das entsprechende Genprodukt bzw. eine Suppression mit den jeweiligen Nachweismethoden quantifiziert werden.

Hierzu müssen das Plasmid als auch das DNAzym, beides sehr sperrige und große Moleküle, zunächst einmal die Aufnahme in die Zelle über die Membran bewerkstelligen und am richtigen Ort freigesetzt werden. Schließlich muss die DNA in den Zellkern als Ort der Transkription vordringen ohne vorher degradiert oder in zellulären Strukturen abgefangen zu werden (Escoffre et al., 2010).

5.2.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zelllinien auf ihre Einsetzbarkeit für ein Testsystem untersucht. Dabei wurde auf eine einfache Kultivierung und gewisse Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen geachtet. Letzteres war von besonderer Bedeutung, da die Zellen je nach Transfektionsprotokoll mehrfachen Transfektionen und Mediumwechseln sowie potenziell toxischen Substanzen ausgesetzt waren. Auch sollten das verwendete Transfektionsreagenz möglichst schon in Bezug auf die Zelllinie verwendet worden und das jeweilige Nachweisverfahren möglich sein.

Letztendlich fiel die Wahl für beide Konzepte (mCherry-Vektor und psiCheck-Vektor) auf die häufig verwendete Zelllinie HEK-293. Diese Zellen erwiesen sich in den

vergleichend durchgeführten Vorversuchen der vorliegenden Arbeit als sehr stabil und resistent gegenüber Umwelteinflüssen wie etwa Temperaturschwankungen während der Versuchsdurchführung sowie toxischen Einwirkungen durch die Transfektion. Außerdem ist die HEK-293-Zelllinie in der Transfektion weit verbreitet, sodass viele Transfektionsprotokolle schon anhand dieser Zelllinie ausgetestet und etabliert wurden. Bezüglich der Kultivierung der Zellen war eine gewisse Optimierung notwendig. Bei der Analyse des rot fluoreszierenden Signals durch das mCherry-Protein kam es zur Detektion roter Fluoreszenz auch in den Negativkontrollen, sodass von einer Beeinflussung durch Phenolrot im Zellkulturmedium ausgegangen wurde. Ein Austausch gegen ein farbloses Medium, welches kein Phenolrot als pH-Indikator enthält, führte zur Behebung der Problematik.

Insgesamt gestaltete sich die Analyse mittels verschiedener Methoden (FACS, RNA-Aufreinigung, Spektroskopie und Konfokalmikroskopie etc.) als technisch gut durchführbar. Zu beachten in Bezug auf die HEK-293-Zellen ist die eingeschränkte Übertragbarkeit der Resultate auf natürlich vorkommende Körperzellen, da es sich um eine genetisch modifizierte Zelllinie handelt (Graham et al., 1977). Dieser Nachteil war in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht von Relevanz, da es sich um die Entwicklung von *in vitro*-Systemen ohne die Intention einer Übertragbarkeit auf natürlich vorkommende Organismen handelte.

Ebenfalls unkompliziert in der Kultivierung und Transfektion sowie äußerst stabil gegenüber Umwelteinflüssen ist die Zelllinie HeLa. Diese Zellen zeigen eine Anpassungsfähigkeit an unterschiedlichste Umgebungen und ein ausgeprägtes Wachstum, da sie die Eigenschaft der Kontaktinhibition im Laufe der Zeit eingebüßt haben (Stephenson, 1982). Dadurch kommt es wiederum leichter als bei anderen Zelllinien zur Kontamination fremder Zellkulturen (Capes-Davis et al., 2010), sodass die HEK-293-Zellen bei gleich guter Transfektionseffizienz bevorzugt wurden.

Neben HEK-293- und HeLa-Zellen wurden zu Beginn auch die Zelllinien A549 und COS-7 verwendet, die sich allerdings als ungeeignet erwiesen, da sie zu starker Agglomeration neigten und sich daher die Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS) schwierig gestaltete. A549-Zellen zeigten außerdem eine hohe Hintergrundfluoreszenz in der Fluoreszenzmikroskopie.

5.2.2 Transfektion – Gratwanderung zwischen hohem Schutz und optimaler Freisetzung der DNA

Es gibt verschiedene Methoden, Nukleinsäuren in lebende Zellen einzubringen. Zm einen wird zwischen der stabilen und der transienten Transfektion unterschieden. Bei der erstgenannten Variante wird die fremde DNA in das Genom der transfizierten Zelle integriert. Häufig wird hier gleichzeitig ein Genabschnitt transfiziert, der die veränderten Zellen resistent gegenüber Stressfaktoren macht. So können nach Behandlung mit beispielsweise einem Toxin als Stressfaktor nur die Zellen mit der integrierten DNA überleben und diese ab diesem Zeitpunkt an alle ihre Tochterzellen weitergeben. Im Gegensatz dazu wird die Fremd-DNA bei der transienten Transfektion zwar in die Zellen aufgenommen, bleibt aber außerhalb des Zell-Genoms. Dadurch wird sie mittels Mitose zeitlich limitiert lediglich an eine Teilpopulation der Tochterzellen weitergegeben oder auch degradiert (Cheeks et al., 2009).

Die letztere Methode wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt. Der Vorteil liegt im geringeren Zeitaufwand, der mit einer Kosteneinsparung verbunden ist, außerdem in einem abgeschwächten (da nur vorübergehenden) Einfluss toxischer Substrate. Nachteilig sind hingegen die niedrigere Expression, da diese nicht kontinuierlich erfolgen kann, sowie eine zeitliche Limitierung, die mit der Lebensdauer des genetischen Konstrukts korreliert (Cheeks et al., 2009).

Die Verfahren, um die Zellmembran zu penetrieren und das Material so in die Zelle einzuschleusen, dass es dort verfügbar ist, sind ähnlich. Prinzipiell gibt es chemische, physikalische und biologische Ansätze für eine Transfektion.

In der vorliegenden Arbeit wurde die häufig verwendete Lipotransfektion als Vertreter der chemischen Methoden eingesetzt. Das Prinzip der Lipotransfektion wurde 1987 von Felgner und Kollegen entwickelt (Felgner et al. 1987). Die Zellmembran ist wie auch Nukleinsäuren negativ geladen, was ihr eine besondere Stabilität verleiht (Shahidullah und London, 2008). Dementsprechend kann es beim Versuch einer Aufnahme über Endozytose zu elektrostatischen Abstoßungsreaktionen kommen. Der Einsatz kationischer, lipophiler Substanzen führt zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Oligonukleotiden und der Zellmembran. Außerdem wird durch Komplexierung der DNA eine Verkleinerung des Moleküls erreicht, sodass insgesamt ein Passieren der Zellmembran erleichtert werden kann (Choosakoonkriang et al., 2003; Eastman et al., 1996). In den neunziger Jahren konnte gezeigt werden, dass es

auf das Mengenverhältnis zwischen dem kationischen Reagenz und der DNA ankommt, das mit 1,5:1 die günstigste elektrostatische Ladung für eine Passage der Zellmembran aufweist (Eastman et al., 1996). Auch später stellten weitere Arbeitsgruppen fest, dass das Verhältnis zwischen 1:1 und 2:1 liegen sollte (Kearns et al., 2010). Entsprechend wurde auch in der vorliegenden Arbeit zu Beginn ein Verhältnis von kationischem Reagenz und DNA von 1,5:1 angewandt und im Verlauf nur gering modifiziert. Letztendlich entsteht auf diese Weise ein endozytotisches Vesikel um den Komplex aus Transfektionsreagenz und Gensubstrat, das die aufzunehmende DNA vor Degradation durch plasmatische Nukleasen schützt (Rattan et al., 2013). Dieser Schutz wird erkauft mit dem Nachteil einer erschwerten intrazellulären Freisetzung des eingeschleusten Materials. Also musste ein Transfektionsansatz gefunden werden, der zum einen einen sicheren Transport zum eigentlichen Zielort des genetischen Materials gewährleistet, zum anderen aber die notwendige Freisetzung dort nicht verhindert.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien und Transfektionsprotokolle hinsichtlich der erreichten Transfektionseffizienz, Zelltoxizität bei Mehrfachtransfektion und Komplexität des Versuchsprotokolls ausgetestet. Da dies teilweise in Vorversuchen durchgeführt wurde, sind nicht alle Ergebnisse detailliert in Kapitel 4 dargestellt. Eine Gegenüberstellung von Vor- und Nachteilen der einzelnen Substanzen, wie sie sowohl in der vorliegenden Arbeit auftraten als auch in der Literatur beschrieben sind, bietet Tabelle 6 (s. Tabelle 6).

Bezüglich der Plasmidtransfektion fiel die Wahl unter Berücksichtigung dieser Kriterien auf das lipophile Transfektionsreagenz LT1. Der Erfolg variierte allerdings abhängig vom eingesetzten Plasmid-Material. Wie im Ergebnisteil ausführlicher dargestellt ist, war die Expression des psiCheck-Vektors ausreichend nachweisbar (siehe 4.2.2), während die des mCherry-Vektors so gering war (siehe 4.2.1), dass aufwändigere Nachweismethoden angewandt werden mussten.

Eine Suppression der Expression durch Behandlung mit dem DNazym gelang in keinem der beiden Ansätze (siehe 4.4). Es wurde zunächst davon ausgegangen, dass eine Schwierigkeit beim Transport des Oligonukleotids in die Zelle bestand. In der FACS-Analyse konnte allerdings eine ausreichende Aufnahme des FAM-markierten DNazyms nachgewiesen werden (siehe 4.3.2), sodass ein Problem bei der Freisetzung an vorgesehener Stelle vermutet wurde. Ein Transfektionsansatz, der diese beiden Transfektionshindernisse berücksichtigen soll, arbeitet mit dem kommerziell erwerblichen lipophilen Transfektionsreagenz Escort und dem ursprünglich als

Antimalariamedikament verwendeten Chloroquine. Escort bildet ebenfalls Komplexe mit der DNA zur endozytotischen Aufnahme, enthält aber neben den kationischen Lipiden additional liposomale Strukturen, welche einen zusätzlichen Schutz der DNA vor Degradation bieten sollen. Dadurch konnte eine erhöhte Transfektionseffizienz im Vergleich zu Transfektionsansätzen erzielt werden, die ausschließlich mit kationischen Lipiden arbeiten (Tabatt et al., 2004). Währenddessen konnte in Bezug auf Chloroquine gezeigt werden, dass es eine bessere Fusion der Transportvesikel mit der Zellmembran und damit eine erleichterte Freisetzung der DNA erzielen kann, sowie in der Lage ist, den pH-Wert in Lysosomen zu erhöhen (Wong-Bazea et al., 2012). Letztere verschmelzen im Zellinneren mit den internalisierten endozytotischen Vesikeln (Endosomen) und enthalten hydrolytische Enzyme, die in Anwesenheit eines sauren Milieus eine DNA-Degradation bewirken können (Goldman et al., 2009). Über eine pH-Wert-Erhöhung in den Lysosomen kommt es nun zur Inaktivierung dieser Enzyme und entsprechend zu einem Schutz der DNA vor Abbau (Baltazar et al., 2012). Auch der niedrige pH-Wert in Endosomen, welche die DNA enthalten, wird erhöht. Das saure Milieu begünstigt normalerweise eine Lyse der Vesikel und Verschmelzung mit Lysosomen (Huotari und Helenius, 2011). Trotz dieses eher konsolidierenden Effekts kommt es durch den Einsatz von Chloroquine über einen osmotischen Effekt mit nachfolgender Ruptur insgesamt eher zur Destabilisierung der Membran und Lyse der Endosomen (Khalil et al., 2006).

Der Nachteil einer Kombination von Escort mit Chloroquine ist allerdings eine Größenzunahme des aufzunehmenden Moleküls, was eine Aufnahme in die Zelle gegebenenfalls behindern kann (Tabatt et al., 2004). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit als Verschiebung der transfizierten Zellpopulation in der FACS-Analyse gesehen (siehe 4.3.2). Es ist möglich, dass sich hierdurch auch die erhöhte Zelltoxizität erklären lässt, die sich nur in der Zellgruppe zeigt, die mit dem Komplex aus dem DNAzym und Escort/Choloquine behandelt ist. Der Ansatz, dem nur der Transfektionsansatz aus Escort und Chloroquine allein zugefügt wurde, weist eine höhere Überlebensrate auf (s. 4.3.1 und 4.3.2). In der Literatur wird ein erhöhter zelltoxischer Einfluss durch Hinzufügen von Chloroquine abhängig von der Expositionsdauer kontrovers diskutiert (Wong-Bazea et al., 2012; Khalil et al., 2006; Ciftci und Levy, 2001). Nichtsdestotrotz konnten in unserer Arbeitsgruppe im Anschluss an die vorliegende Arbeit vergleichende Versuche von Frau Dr. A. Turowska eine geringere Toxizität bei alleiniger Verwendung von Escort mit trotzdem ausreichender Transfektionseffizienz zeigen.

Tabelle 6 Transfektionsreagenzien (TR): Gegenüberstellung von Vor- und Nachteilen
Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (teilweise aus Vorversuchen) und aus der Literatur

TR	Vorteile	Nachteile	Konsequenzen für die Arbeit
DharmaFECT	Unkompliziertes Protokoll	Unzureichende Transfektionseffizienz (s. 4.2.2)	Ausschluss aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz
DOTAP	Gute Transfektionseffizienz (> 60% in der Literatur; Martino, 2009)	Ausgeprägte Zytotoxizität (eigene Ergebnisse, nicht dargestellt; Jain, 2013)	Nährmediumwechsel nach 12 h zur Reduktion der Zytotoxizität, letztlich Ausschluss
Escort/ Chloroquine	Gute Transfektionseffizienz, da Schutz vor DNA-Degradation (Tabatt, 2004; Lechardeur, 1999) Erleichterte Freisetzung der DNA (Wong-Bazea, 2012; eigene Ergebnisse s. 4.3)	Hohe Zytotoxizität durch Chloroquine (Wong-Bazea, 2012; eigene Ergebnisse s. 4.3.1)	Nährmediumwechsel nach 4 h zur Reduktion der Zytotoxizität, Einsatz zur Transfektion des DNAzyms
Genejuice	Keinerlei Eigenfluoreszenz nachweisbar in der Fluoreszenzmikroskopie	Unzureichende Transfektionseffizienz (eigene Ergebnisse, nicht dargestellt; Hong, 2004)	Ausschluss aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz
Lipofectamine	Kaum Eigenfluoreszenz nachweisbar in der Fluoreszenzmikroskopie Unkompliziertes Protokoll	Unzureichende Transfektionseffizienz (eigene Ergebnisse, nicht dargestellt; Forsbach, 2011)	Ausschluss aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz
LT1	Gute Transfektionseffizienz Geringe Zytotoxizität (eigene Ergebnisse s. 4.2 und 4.3; Morrey, 2007) Unkompliziertes Protokoll	<i>Keine nennenswerten Nachteile im Rahmen der durchgeführten Versuche</i>	Einsatz zur Transfektion der Plasmide und des DNAzyms
PEG-PEI	Gute Transfektionseffizienz Hohe Stabilität (eigene Ergebnisse s. 4.2; Hoskins, 2012)	Hohe Zytotoxizität (eigene Ergebnisse, nicht dargestellt; Kim, 2005) Hoher Preis	Initial Einsatz zur Vektor-Transfektion, letztlich Entscheidung für LT1 (s. Nachteile)
Tfx	Gute Transfektionseffizienz Geringe Zelltoxizität (eigene Ergebnisse s. 4.2; Abul-Hassan, 2000) Unkompliziertes Protokoll	Höherer Preis, z.B. im Vergleich zu LT1	Initial Einsatz zur Vektor-Transfektion, letztlich Entscheidung für LT1 (s. Nachteile)

Eine Alternative zu Chloroquine könnte der Einsatz von Saccharose in Kombination mit einem Transfektionsreagenz wie Escort bzw. einem kationischen Lipid ohne Liposomzusatz bieten. Eine vergleichende Arbeit von Ciftci und Levy hat eine deutlich geringere Toxizität bei außerdem noch höherer Transfektionseffizienz gezeigt. Das Wirkprinzip hierbei besteht ebenfalls in einer Destabilisierung der Endosomenmembran durch Osmose mit anschließender Lyse (Ciftci und Levy, 2001).

5.2.3 Alternative Verfahren zur Einbringung von DNA in die Zellen

Da ein Transfektionserfolg trotz Austestung und Optimierung verschiedener Protokolle nicht immer gegeben war, stellt sich die Frage nach praktikablen Alternativen.

Ein Beispiel für ein physikalisches Verfahren, bei dem die Permeabilisierung der Zellmembran durch das Erzeugen eines elektrischen Feldes zustande kommt, ist die Elektroporation (Nucleofektion). Diese Methode weist im Vergleich zu verschiedenen chemischen Transfektionsverfahren eine höhere Transfektionseffizienz auf. Zudem wurde ein geringerer Zelluntergang beobachtet, sodass eine niedrigere Zytotoxizität vorliegt (Maurisse et al., 2010). Schließlich zeigte eine weitere Untersuchung aus dem Jahr 2010 die Gleichwertigkeit der beiden Methoden in Bezug auf die Transfektionseffizienz (Smirnikhina et al., 2010). Ob die Elektroporation eine Option in Bezug auf das vorliegende Projekt zur Erstellung der DNAzym-Testsysteme darstellt, muss an dieser Stelle offen gelassen werden und könnte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Weitere non-virale Verfahren sind beispielsweise die Calcium-Phosphat-Präzipitation (Chenuet et al., 2008) oder die zwar sehr zellschonende, aber bei Vorliegen geringer Zellzahlen sehr aufwändige und damit limitiert einsetzbare Mikroinjektion (Zhang und Ju, 2008). Auf diese Verfahren soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden. Als Beispiel für ein biologisches Verfahren sollte allerdings noch die Einschleusung von genetischem Material mittels Phagen erwähnt werden. Man spricht hier nicht mehr von Transfektion, sondern vom Prinzip der Transduktion, das 1976 durch Goff und Berg erstmalig beschrieben wurde (Goff und Berg, 1976). Die Gründe, die für die vorliegende Arbeit trotz in der Literatur berichteter hoher Erfolgsraten (Klimczak et al., 2009) bereits bei der Planung zum Ausschluss eines Phageneinsatzes geführt haben, sind neben erhöhtem Aufwand der toxische Einfluss auf die Zellen, der direkt durch die viralen Proteine oder (*in vivo*) durch die Immunreaktion des Organismus zustande kommt (Hasbrouck und High, 2008).

In den letzten Jahren wurden als Alternative zu den bisherigen Transfektionsverfahren verstärkt Protokolle entwickelt, die Nanopartikel zum Einbringen von zellfremden Material in eine Zelllinie verwenden. Besonders Gold enthaltende Nanopartikel zeigten sich hier sowohl stabil als auch effizient bei erhöhter Affinität zur DNA und werden demnach häufig eingesetzt. Im Vergleich mit herkömmlichen Lipotransfektions-Protokollen wies eine Transfektion mittels Nanopartikeln eine signifikant höhere Effizienz bei leider teilweise stärker ausgeprägter Zelltoxizität auf. Ein umgekehrter Effekt wurde bei Anwendung von magnetisch assistierten Verfahren beobachtet (Durán et al., 2011).

5.3 Bindung und Degradierung der RNA durch das DNAzym

Mithilfe des optimierten Transfektionsprotokolls aus Escort und Chloroquine konnte eine ausreichende Aufnahme des DNAzyms in die Zellen nachgewiesen werden (siehe 4.3.2). Neben dem Problem einer fehlenden oder an falscher Stelle stattfindenden Freisetzung des DNAzyms aus den Transportvesikeln, wie unter 5.2.3 beschrieben, kann eine Schwierigkeit im Angriff des Moleküls auf seine RNA-Zielstruktur liegen.

5.3.1 Einfluss der Zielstruktur

Man weiß, dass RNA in den Zellen in energetisch günstigen Konformationen vorliegt, was bedeutet, dass eine lineare Struktur zu schwer zugänglichen Sekundär- und Tertiärstrukturen gefaltet wird (Butcher und Pyle, 2011). Zunächst ging man von einem zweistufigen Prozess aus: nach Formation der Sekundärstruktur bildet sich die dreidimensionale Tertiärstruktur. Im Verlauf stellte man allerdings fest, dass die Bildung energetisch günstiger Konformationen der RNA gerade nicht hierarchisch, sondern in unabhängigen, parallel ablaufenden Schritten erfolgt (Duncan und Weeks, 2010). Aufgrund der diversen Möglichkeiten, energetisch günstige Bindungen einzugehen, kann es daher vorkommen, dass verschiedene Bereiche einer RNA-Sequenz ihre Sekundär- bzw. Tertiärstruktur zeitgleich oder in unterschiedlicher Geschwindigkeit ausbilden (Chakraborty et al., 2014). Allen Hypothesen gemeinsam ist, dass sie von einem Vorliegen verschiedener komplexer RNA-Konformationen ausgehen. Dies beeinflusst den Angriff der RNA durch ein Antisense-Molekül erheblich, da dieses auf den Zugang zu einer spezifischen Sequenz angewiesen ist (Vickers et al., 2014). Man geht davon aus, dass ein Großteil aller möglichen

Zielsequenzen für DNAzyme nicht zugänglich und damit auch nicht degradierbar sind (Wang YF, 2011; Kurreck et al., 2002).

Um die mRNA spalten zu können, ist eine Hybridisierung mit dem DNAzym notwendig, die nicht möglich ist, wenn es innerhalb der mRNA-Sequenz bereits über Hybridisierung zur Ausbildung der Sekundärstruktur gekommen ist (Wang YF, 2011). Aus dieser Vorstellung heraus kamen Ding und Lawrence 2001 zu dem Schluss, dass die Effektivität von Antisense-Molekülen dadurch erhöht werden kann, dass man ihnen den Angriff auf einzelsträngige mRNA-Abschnitte ermöglicht. Diese liegen außerhalb der gefalteten Sekundär- und Tertiärstrukturen beispielsweise als loop- oder hairpin-Strukturen im Molekül vor (Ding und Lawrence, 2001). Das DNAzym müsste dementsprechend passend zu diesen randständigen Arealen konstruiert werden. Wieder andere Forscher postulieren, dass es sich nicht ausschließlich um einen sequenzspezifischen Angriff des DNAzyms handelt, sondern die mRNA letztendlich über Sequenz-unabhängige antisense-Mechanismen degradiert wird (Stein, 2001). Hierzu gehören auch unspezifische Spaltungs-Effekte, die zustande kommen können, wenn Antisense-Moleküle Strukturen erkennen und binden, die mit ihren Zielstrukturen nur partiell übereinstimmen (Doran und Sohail, 2006).

Insgesamt wird also die Schwierigkeit eines Zugangs des DNAzyms zu seiner Zielstruktur und deren spezifische Erkennung deutlich, die für eine ausbleibende Suppression verantwortlich sein könnte.

5.3.2 Einfluss der DNAzym-Struktur

Die DNAzyme werden so generiert, dass die katalytische Region von sequenzspezifischen Bindungsarmen flankiert wird, die an die dazugehörige Zielstruktur binden sollen. Eine Änderung der Basenabfolge innerhalb der katalytischen Region hat weit reichende Folgen. Bereits ein einzelner Basenaustausch kann zur fehlerhaften Faltung und damit zum kompletten Aktivitätsverlust des DNAzyms führen (Jung et al., 2012). Nachdem zunächst davon ausgegangen worden war, dass eine Modifikation im Bereich der Bindungsarme keinen Einfluss auf die Wirkung hat, zeigte sich im Verlauf, dass eine Veränderung der Nukleotidabfolge Konsequenzen für die enzymatische Aktivität hat. In manchen Fällen reichte die spezifische Bindung einer der beiden Arme an die Zielstruktur aus (Doran und Sohail, 2006). Andere Daten zeigten, dass Modifikationen am 3'- wie auch am 5'-Ende des Oligonukleotids eine Relevanz für eine erfolgreiche Interaktion haben. Dies führt so weit, dass bereits der Austausch

von 1-2 Nukleotiden die Wirkung eines DNAzyms komplett verändern kann (Abdelgany et al., 2005). Die Unterschiede bezüglich der Effizienz durch Kürzen, Verlängern oder Veränderung der Basenabfolge der Bindungsarme reichen von Wirkverlust über Unbeeinflussbarkeit bis hin zur Zunahme des gewünschten Effekts (Cairns et al., 2000).

McQuisten and Peek konnten zeigen, dass zur spezifischen Interaktion des Oligonukleotids mit der mRNA neben einer passend generierten Basenfolge das Vorhandensein eines bestimmten Nukleotidmotivs von Bedeutung ist. Sie untersuchten verschiedene Basenabfolgen in variierender Länge (2-5 Basen) und beschrieben für 155 dieser Motive eine hohe, für 202 Motive hingegen eine niedrige enzymatische Aktivität des Oligonukleotids (McQuisten und Peek, 2007). Erstmals war der Einfluss spezifischer Basenabfolgen auf die Aktivität von Antisense-Molekülen von Tu et al. 1998 beschrieben worden. Diese hatten festgestellt, dass ein TCCC-Motiv innerhalb eines Antisense-Moleküls über die Bindung des korrespondierenden GGGA-Motivs im mRNA-Transkript zu einer überdurchschnittlich hohen Suppressionsrate des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) führt (Tu et al. 1998). Eingeschränkt wird dieses Konzept durch das bereits genannte „next-nearest-neighbor“-Modell, das die Einflüsse benachbarter Nukleotide untereinander beschreibt. Durch überlappende Basenpaarmotive innerhalb des Antisense-Moleküls kommt es zu thermodynamischen Interaktionen, sodass eine einzelne Nukleotidabfolge nicht isoliert betrachtet werden kann (Gray et al., 2010). Diese Erkenntnisse könnten entsprechend auch für das Design eines GATA-3-DNAzyms eine Rolle spielen, um dessen Wirkung zu erhöhen.

5.4 Expression der Zielstruktur – Störfaktoren bei Transkription und Translation

Geht man davon aus, dass die Optimierung der Transfektionsprotokolle dazu geführt hat, dass das DNAzym ohne Schaden zu nehmen zu seiner Ziel-RNA transportiert wurde und dort auch adäquat binden konnte, muss das Problem einer ausbleibenden Suppression an anderer Stelle liegen. Wird beispielsweise die DNA des eingeschleusten Vektors nicht transkribiert, so kann auch keine mRNA entstehen, die dem DNAzym als Angriffspunkt dient. Ähnlich können nach stattgefundener Transkription Hindernisse bei der Translation oder an noch späterer Stelle bei der Signaldetektion entstehen.

5.4.1 IRES im mCherry-GATA-3-Vektor: Einfluss auf die Genexpression

Bezüglich des mCherry-GATA-3-Expressionsvektors war zwar die Genexpression von mCherry allein sehr niedrig, konnte aber sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden (siehe 4.2.1). Somit ist es aber möglich, dass die Menge an transkribierter RNA zu niedrig war, um einen Effekt durch das DNAzym nachzuweisen. Andererseits gelang es nicht, den GATA-3-Abschnitt oder das Gesamtprodukt aus mCherry und GATA-3 mittels PCR nachzuweisen, weder im Vektor selbst, noch in den Zellen. Eine Sequenzierung zeigte allerdings, dass der GATA-3-Abschnitt in den mCherry-Vektor eingebaut wurde. Es könnte also zu einer Störung bereits auf Ebene der Transkription oder Translation gekommen sein, die letztendlich nur eine Synthese des mCherry-Abschnittes erlaubt hat. Eine Fülle von Interaktionen zwischen intrazellulären Faktoren und Komponenten des Expressionsvektors ist denkbar, daher soll hier nur exemplarisch auf eine mögliche störende Interaktion eingegangen werden. Der zu transkribierende Vektorabschnitt enthält den für mCherry und GATA-3 kodierenden Genabschnitt nicht an einem Stück. Nach einem T7-Pomotor findet sich zuerst die GATA-3-Sequenz (an der Schnittstelle für EcoRV eingefügt), dann eine Struktur namens IRES und schließlich das mCherry-Gen (s. Abb. 6).

Bei IRES handelt es sich um die so genannte interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. internal ribosomal entry site), die eine Bindung der Ribosomen zur Translation in Abwesenheit anderer Initiierungsfaktoren und unabhängig von einem Start an der 5'-cap-Struktur am Ende der mRNA vermitteln kann. Sie wurde ursprünglich im Poliovirus und im Encephalomyocarditis-Virus entdeckt und RLP (ribosome landing pad) genannt (Pelletier und Sonnenberg, 1988; Jang et al., 1988), ist aber sowohl in vielen viralen (Chase und Semler, 2014; Moss et al., 2014) als auch zellulären (Martínez-Salas et al., 2013) mRNA-Abschnitten enthalten. Wahrscheinlich existiert dieser Mechanismus in natura, um eine 5'-cap-unabhängige Proteinsynthese in der Zelle im Sinne einer Homöostase trotz Vorhandensein von Stressbedingungen wie Temperaturschwankungen, Hypoxie, Nährstoffmangel oder Irritation durch Strahlung zu gewährleisten (Barrett et al., 2012; Komar und Hatzoglou, 2005).

In der Molekularbiologie wird IRES gern in Expressionsvektoren eingefügt, die ebenso wie die in dieser Arbeit verwandten Reportergensysteme zwei Genabschnitte enthalten (Mohrs et al., 2005). Die Idee dabei ist, dass der erste Genabschnitt ausgehend vom vorgeschalteten Promotor über eine 5'-cap-Aktivierung translatiert wird. Der zweite Genabschnitt würde dann mit Hilfe von IRES durch eine 5'-unabhängige Bindung an

das Ribosom direkt abgelesen, um eine Co-Expression der beiden Genabschnitte und eine insgesamt höhere Expressionsraten des nachgeschalteten Abschnitts zu ermöglichen als nur nach Initiierung durch den T7-Promotor zu Beginn (Payne et al., 2013; Bochkov und Palmenberg, 2006). Auch die Länge der Nukleotidsequenz zwischen dem Stopp-Codon des ersten und dem Start-Codon des zweiten Genabschnitts spielt für die Expression eine Rolle. Eine effiziente Re-Initiierung der Translation am 2. Intron ist wahrscheinlicher, umso größer die Distanz zum ersten Intron ist. Handelt es sich um nur kurze Nukleotidabfolgen oder sind die Basenabfolgen gar überlappend, ist die Effizienz der 5'-unabhängigen Initiierung der Translation gering (Ferreira et al., 2013). Ebenso wenig sollte die IRES-Sequenz zu nah am ersten Intron liegen, sonst kann es zur Beeinflussung der Translation dieses Abschnitts kommen. Entsprechend spielen die Länge des ersten Introns oder ihm nachgeschaltete Basenabfolgen bis zum 5'-Ende von DNA eine Rolle (Payne et al., 2013; Bochkov und Palmenberg, 2006).

Das Einfügen eines IRES-Abschnitts kann auch aus anderen Gründen negative oder einfach überhaupt keine Auswirkungen auf die Translationseffizienz der beiden Gene haben. So existieren beispielsweise verschiedene IRES-Formen, die sich je nach Vektorkonstrukt unterschiedlich verhalten (Saffran et al., 2010; Attal et al., 2000). Eine weitere bedeutsame Variable ist die verwendete Zelllinie, da die variierenden Bestandteile des intrazellulären Milieus jeweils eigene Interaktionen mit dem Vektorkonstrukt bzw. DNA ausbilden und so wiederum die Translation beeinflussen (Plank et al., 2013).

Es wird deutlich, dass sich das Vorhandensein von IRES auf die Translation der beiden Genabschnitte von Interesse (in diesem Fall mCherry und GATA-3) auswirkt. Da das Element zwischen beiden Sequenzen liegt, ist es aufgrund der beschriebenen Möglichkeiten einer Interferenz denkbar, dass letztlich die Translation der Gesamtsequenz mCherry-GATA-3 gestört ist.

5.4.2 Beeinflussung der Expression der Firefly- und Renilla-Luciferase

Da das Reportersystem bestehend aus Firefly und Renilla bereits etabliert und häufig eingesetzt wird, gibt es hier weniger unerwartete Störfaktoren. Die Expression der Luciferasen ist jedoch abhängig von der Menge der transfizierten DNA. Hier gilt zunächst einmal: je höher die Plasmid-Dosis, desto stärker die Signalintensität bei der Analyse. Dennoch konnte nachfolgend gezeigt werden, dass es eine Limitierung gibt. Ab einer bestimmten Menge eingesetzter DNA kommt es zu einer Verminderung der

Genexpression und damit der Emission. Eine ausreichend nachweisbare Lumineszenz war bei einer eingesetzten DNA-Menge von 0,02-0,05 ng/ μ l nachweisbar. Bezogen auf eine 96-well-Platte entspricht dies 2-5 ng/well (Ghazawi et al., 2004).

In vitro wurden diverse Faktoren untersucht, die nachweislich zu einer Beeinflussung der Luciferaseexpression führen. Beispielsweise wird sie durch die Anwesenheit von Dexamethason, nukleären Rezeptoren oder Cytokinen wie IFN- α und - β supprimiert. Andere Proteine, wie z.B. Androgene oder auch GATA-4 und GATA-6 (GATA-3 wurde nicht untersucht), führen zur Steigerung der Expression (Shifera und Hardin, 2010). Gleichmaßen konnte in anderen Bereichen der molekularbiologischen Forschung beim Einsatz der Renilla-Luciferase eine Abhängigkeit der Expression von der verwendeten Zelllinie, dem vorgeschalteten Promotor oder endogenen Co-Faktoren der Transkription gezeigt werden (Mulholland et al., 2004).

Die Ergebnisse dieser Studien bezüglich einer Cytokin- oder Hormonbeeinflussung sind für die vorliegende Arbeit eher von untergeordneter Bedeutung, da die HEK-293 Zelllinie weder entsprechende Mediatoren exprimiert noch damit behandelt wurde. Dennoch können sie als Beispiel dafür dienen, dass zelleigene Strukturen und Mediatoren die Expression einer zellfremden, internalisierten DNA beeinflussen können.

5.5 Hindernisse bei der Signaldetektion

Bereits bei der Darstellung der Ergebnisse wurden Probleme beim Nachweis der Fluoreszenz durch mCherry genannt. Als Grund wurde neben einer ungenügenden Proteinexpression der eingegrenzte Wellenlängenbereich des emittierten roten Lichts genannt, der zwar den Vorteil einer sehr spezifischen Signaldetektion bietet (s. 5.1.1), aber spezieller Filter und Analysemethoden bedarf. Wu et al. erstellten 2009 das Modell eines Vorliegens von mCherry in zwei Zustandsformen, einer leuchtenden und einer nicht-leuchtenden Variante. Sie beschreiben außerdem die Möglichkeit weiterer existierender Versionen mit unterschiedlicher Signalaktivität. Darüber hinaus haben sie das Fusionsverhalten der unterschiedlichen mCherry-Zustände untereinander und mit anderen zellulären Proteinen beobachtet (Wu et al., 2009).

Der Nachweis von Lumineszenz durch die Luciferasen Firefly und Renilla bereitete deutlich weniger Probleme. Hier war eine ausreichende Signalintensität detektierbar, sofern auf eine zeitnahe Analyse bei deutlich kürzerer Halbwertszeit der umgesetzten Enzymsubstrate im Vergleich zu mCherry geachtet wurde.

Sowohl die Emission von Fluoreszenz als auch von Lumineszenz kann durch das so genannte Quenching beeinträchtigt werden. Hierbei führt beispielsweise die Anwesenheit von Ionen (Tan et al., 2011) zu einer Reduktion des Signals. Bereits 1938 beobachtete der deutsche Forscher Hans Kautzky einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Sauerstoff und einer Verringerung der detektierbaren Lumineszenz (Kautzky, 1938). Die Theorie der Dimerisierung geht wiederum davon aus, dass fluoreszierende Monomere durch Dimer-Bildung zu Produkten werden, deren Fähigkeit zu fluoreszieren stark eingeschränkt oder nicht mehr vorhanden ist (Ogawa et al., 2009). Quenching kann zwar auch als Analysemethode verwendet werden, ist aber häufiger ein unerwünschtes Phänomen, wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, eine Signalreduktion durch Behandlung mit Testsubstanzen untersucht werden soll.

5.6 Ausblick

Es wird deutlich, wie komplikationsbehaftet jeder Schritt zur Entwicklung eines neuen *in vitro*-Testsystems für Antisense-Moleküle wie die DNAzyme ist. Letztendlich konnte in keinem der in dieser Arbeit vorgestellten Ansätze eine erfolgreiche Regulation durch die Behandlung mit dem DNAzym gezeigt werden. Dennoch war in unterschiedlicher Weise zumindest eine erfolgreiche Genexpression des erstellten Expressionsvektors nachweisbar.

Bezüglich des mit Fluoreszenz arbeitenden Systems aus dem mCherry-Vektor und GATA-3 war die Proteinexpression von mCherry so gering, dass sie nur mit empfindlichen Nachweismethoden wie der Konfokalmikroskopie oder indirekt über eine PCR gezeigt werden konnte. Eine Transkription des GATA-3-Abschnitts war nicht darstellbar, sodass auch der eigentliche Schritt, ein Nachweis der Suppression, unmöglich war. Dennoch zeigten ein Kontrollverdau und die Sequenzierung des Expressionsvektors ein Vorhandensein des GATA-3-Inserts.

Auch wenn eine Suppression der Lumineszenz durch eine Behandlung des psiCheck-GATA3-Vektors mit hgd40 ebenso wenig gelang, war hier zumindest eine erfolgreiche Expression der Luciferasen und des GATA-3-Inserts nachweisbar. Darüber hinaus konnte eine Aufnahme des DNAzyms über Transfektion mittels Escort/Chloroquine gezeigt werden. Folglich scheint dieses System in der Zusammenschau für weitere Untersuchungen geeigneter.

5. Diskussion

In den vorherigen Abschnitten werden bereits einige unternommene und zusätzlich mögliche Lösungsansätze auf den verschiedenen Ebenen der Erstellung eines Testsystems geschildert. Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit führten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Versuche mit modifizierten Transfektionsprotokollen durch (s. 5.2.2). Ob eine weitere Optimierung oder komplett neue Ansätze zum gewünschten Erfolg führen werden, bleibt abzuwarten.

6. Zusammenfassung

Allergisches Asthma bronchiale gehört zu den häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen in den industrialisierten Ländern. Die Betroffenen leiden unter einer Hyperreagibilität des Bronchialssystems, rezidivierender bronchialer Obstruktion und Entzündung und schließlich einem sogenannten “Airway Remodelling” mit irreversiblen strukturellen Veränderungen. Die Genese der Erkrankung ist multifaktoriell. Pathophysiologisch führt der Kontakt mit Allergenen zu einer Kaskade des Immunsystems, an deren Ende die Degranulation von Mastzellen mit massiver Freisetzung der Substanzen steht, welche die typische allergische Reaktion hervorrufen. Bei diesem Vorgang spielt ein Ungleichgewicht der T-Helferzellen mit Verschiebung zugunsten der Th2-Subpopulation eine entscheidende Rolle. Die Differenzierung in diese Richtung wird wesentlich durch den Transkriptionsfaktor GATA-3 vermittelt.

Bisher ist eine Therapie des allergischen Asthma bronchiale nur symptomatisch (z.B. mittels β_2 -Sympathomimetika oder Glukokortikoiden) möglich. Nicht nur aufgrund der teilweise signifikanten Nebenwirkungen dieser Substanzen besteht ein „medical need“ für kausale Therapieansätze. Diese aktuell noch bestehende Lücke könnte durch Antisense-Strategien ausgefüllt werden, die über eine Interferenz mit der mRNA eine anschließende Translation und damit Proteinüberexpression unterbinden sollen. DNAzyme beispielsweise binden an mRNA, um sie mittels inhärenter katalytischer Aktivität zu degradieren. Zum Zeitpunkt der experimentellen Phase dieser Dissertation existierte kein einfaches *in vitro*-Testsystem, mit dem man eine verlässliche Aussage zur Effizienz einzelner DNAzyme treffen kann.

Entsprechend sollten in der vorliegenden Arbeit zwei Testsysteme generiert und hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit verglichen werden. In beiden Fällen wurde als Modellsystem das DNAzym hgd40 verwendet, das in der Lage ist, die mRNA des Transkriptionsfaktors GATA-3 zu spalten. Dessen genetische Sequenz wurde zum einen in einen Vektor inkloniert, der zudem den Genabschnitt eines fluoreszierenden Proteins (mCherry) enthält. Zum anderen fand ein Reportergensystem Anwendung, das Genabschnitte für Luciferasen beinhaltet (Vektor psiCheck mit den Luciferasen Firefly und Renilla). Die Degradierung der GATA-3 mRNA durch hgd40 sollte eine Reduktion der Proteinexpression von mCherry und den Luciferasen bewirken, sodass über eine entsprechend verminderte Signaldetektion die Effizienz des DNAzyms messbar gemacht werden kann.

6. Zusammenfassung

Letztendlich gelang es, entsprechende Expressionsvektoren zu konstruieren und mittels Transfektion in Zellen (HEK-293) einzubringen. Auch konnte eine erfolgreiche Transfektion der Zellen mit dem DNAzym gezeigt werden. Allerdings war nach Behandlung mit hgd40 keine Suppression des jeweiligen Signals messbar.

Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Zunächst ist die Wahl der Zelllinie und des Transfektionsreagenz von großer Bedeutung, da Probleme beim Einbringen des DNAzyms in die Zellen oder der intrazellulären Freisetzung in passende Kompartimente auftreten können. Zudem spielt die Struktur der Ziel-mRNA eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Interaktion. Auch kann die Expression der Zielstruktur durch intrazelluläre Faktoren oder Umwelteinflüsse behindert werden und es kann zu Hindernissen bei der Signaldetektion kommen. Zur Vermeidung der genannten Probleme wurden verschiedene Transfektionsprotokolle und Nachweismethoden ausgetestet.

Es wurde deutlich, dass jeder Schritt zur Erstellung eines derartigen Testsystems für DNAzyme komplikationsbehaftet ist und es weiterführender Untersuchungen bedarf. Auch wenn in keinem der beiden vorgestellten Ansätze eine Regulation durch das DNAzym gezeigt werden konnte, so waren bezüglich des Systems psiCheck-GATA-3 zumindest eine ausreichende Expression der Luciferasen und GATA-3 sowie eine intrazelluläre Aufnahme des DNAzyms nachweisbar. Insgesamt scheint dieses System demnach für nachfolgende Untersuchungen geeigneter.

Allergic asthma is one of the most common chronic-inflammatory diseases in industrialized countries. Patients suffer from a hyperreactivity, recurrent bronchial obstruction and inflammation; and finally so-called “airway remodelling”, which represents irreversible structural changes. Genesis of the disease is multifactorial. In its pathophysiology, contact with allergens leads to the initiation of a cascade of immunological events. Downstream this causes the degranulation of mast cells with massive liberation of preformed substances that arouse the typical allergic symptoms. During this process, a misbalance in the equilibrium of different T-helper-cell subtypes with a shift towards the subpopulation of Th2-cells plays a crucial role. The differentiation into this direction is essentially mediated by the transcription factor GATA-3.

To date, allergic asthma may only be treated symptomatically, for example using β_2 -mimetics or glucocorticosteroids. Thus, there is a significant medical need for causative therapeutic approaches, which is further underlined by unwanted side effects of current therapy options. In this matter, antisense strategies might be an approach to fill the still existing gap. They can inhibit translation and subsequent protein overexpression via interference with mRNA. DNAzymes, for example, bind mRNA and later degrade it by their inherent catalytic activity. Unfortunately, so far no simple *in vitro* test system is available to make a reliable statement about the efficiency of individual DNAzymes.

This dissertation aimed to develop two test systems and compare them concerning their suitability for daily use in research. In both cases, the transcription factor GATA-3 was chosen as a target for the DNAzyme hgd40 as model system. In one experimental setting, its genetic sequence was cloned into a vector, which additionally contains the gene locus for a fluorescent protein (mCherry). In the second approach, a reporter gene system was used, which included sequences for luciferases (vector psiCheck with the luciferases Firefly and Renilla). Degradation of the GATA-3 mRNA by hgd40 should cause a reduction of the expression of Cherry or the luciferases respectively, so that the reduced signal detection should demonstrate the efficacy of the DNAzyme.

Finally, it was possible to create the appropriate expression vectors and transfer them into cells (HEK-293) via transfection. At the same time, a successful transfection of the cells with the DNAzyme could be shown. However, after treatment with hgd40 there was no measurable suppression of the signal.

The reasons for this failure might be multiplex. First of all, the choice of the cell line and transfection medium is very important, because problems may occur at the point of uptake or liberation of the DNAzyme in the adequate compartment of the cell.

6. Zusammenfassung

Furthermore, the structure of the target mRNA plays a crucial role for a successful interaction. In addition, the expression of the target structure can be prohibited by intracellular or environmental factors as well as obstacles can arise during signal detection. To avoid the aforementioned problems different assay protocols were tested.

It becomes apparent that every step to create such a test system for DNazymes is afflicted with complications, and that there is a clear need for further experiments. Both test systems did not show any target down-regulation after treatment with the DNzyme. However, sufficient expression of the luciferases and GATA-3 as well as an intracellular uptake of the DNzyme was detectable in the system working with the psiCheck-GATA-3 vector. Therefore, this test system seems to be more suitable for further studies.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin	
Abb	Abbildung	109
AK	Antikörper	
AMP	Adenosinmonophosphat	
APC	Antigen-präsentierende Zelle	
as	antisense	
ASO	Antisense-Oligonukleotid	
ATP	Adenosintriphosphat	
bp	Basenpaare	
C	Cytosin	
C ₂	2. Kohlenstoffatom des Moleküls	
C ₄ H ₁₁ NO ₃	Trishydroxymethylaminomethan	
CD	Cluster of differentiation	
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat	
cDNA	copy DNA	
CIAP	Calf intestine alkaline phosphatase	
CLSM	Confocal laser scanning microscope	
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease	
CT	Threshold cycle	
DC	Dendritische Zelle	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl] N,N,N-Trimethylammonium Methylsulfat	
E/Ch	Escort/Chloroquine	
E.coli	Escherichia coli	
ECRHS	European Community Respiratory Health Survey	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition	
FACS	Fluorescence-activated cell sorter	
FAM	6-Carboxyfluorescein	
FCS	Fetales Kälberserum	
FITC	Fluorescein isothiocyanate	
FSC	Forwardscatter	
G	Guanin	
GATA	GATA binding protein	
GAPDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	

gd21	GATA-3-DNAzym	
GEDA	Studie für Gesundheit in Deutschland	
GFP	Green fluorescent protein	
GINA	Global Initiative for Asthma	110
GR	Glukokortikoidrezeptor	
GSR	Glucocorticoid sensitive region	
h	Stunden	
HEK	Human embryonic kidney cells	
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulonic acid	
hgd	Humanes GATA-3-DNAzym	
HPLC	High-performance liquid chromatography	
HPO_4^{2-}	Hydrogenphosphat	
H_2PO_4^+	Dihydrogenphosphat	
hu	human	
Hut	Human, peripheral blood, lymphoma, cutaneous, T-cell	
ICS	Inhaled corticosteroids	
IFN	Interferon	
Ig	Immunglobulin	
IL	Interleukin	
IRES	Internal ribosomal entry site	
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood	
JAK	Janus Kinase	
K	Klon	
KCl	Kaliumchlorid	
LABA	Long acting beta agonists	
LB	Lysogeny broth medium	
LSM	Laser scanning microscope	
LTRA	Leukotrienrezeptorantagonisten	
LT 1	Low Toxicity 1 transfection reagent	
M	DNA-Größen-Marker	
Med	Medium	
MEM	Minimal essential medium	
Mg^{2+}	Magnesium	
MHC	Major histocompatibility complex	
min	Minuten	
mRNA	messenger RNA	
NaCl	Natriumchlorid	
NaOH	Natriumhypoxid	

NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
OCS	Oral corticosteroids
OD	optische Dichte
ODN	Oligodeoxynucleotid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG-PEI	Pegyliertes Polyethylenimin
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
rA	Ribonucleotid-Adenosin
RABA	Rapid acting beta agonists
RISC	RNA-induced silencing complex
RLP	Ribosome landing pad
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S.	Seite
s.	siehe
se	sense
siRNA	small interfering RNA
SIT	Spezifische Immun Therapie
S.O.C.	Super Optimal broth with Catabolite repression
SSC	Sidescatter
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Transfektionsreagenz
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
W	Wasser
z.B.	zum Beispiel

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Zelluläre und molekulare Mechanismen der Typ-I-Allergie	S. 11
Abb. 2	Differenzierung der Th-1- und Th-2-Zellen	S. 12
Abb. 3	Induktion der IL-4-Expression in Th-2-Zellen	S. 15
Abb. 4	Wirkmechanismen verschiedener Klassen von Antisense-Molekülen	S. 25
Abb. 5	Generelle Struktur eines „10-23“-DNAzyms	S. 27
Abb. 6	Vektorkarte für V.302creIREScherry	S. 41
Abb. 7	Vektorkarte für psiCheck TM 2	S. 42
Abb. 8	Aufbau des Plasmidvektors pCR 2.1 TOPO	S. 45
Abb. 9	Kontrollverdau des mCherry-GATA-3-Vektors mit EcoRV	S. 57
Abb. 10	Fluoreszenzspektroskopie der mit mCherry-GATA-3-Vektor transformierten E.coli-Klone	S. 58
Abb. 11	Nachweis von mCherry-DNA im mCherry-GATA-3-Vektor mittels PCR	S. 59
Abb. 12	PCR unter Zuhilfenahme des Sense-Primers für Cherry und des Antisense-Primers für GATA-3 zum Nachweis der Gesamtsequenz mCherry-GATA-3 im mCherry-GATA-3-Vektor	S. 60
Abb. 13	Kontrollverdau des psiCheck-GATA-3-Vektors mit NotI	S. 62
Abb. 14	Konfokalmikroskopie von HEK-293-Zellen, welche mit dem mCherry-Vektor oder dem mCherry-GATA-3-Vektor transfiziert wurden	S. 66
Abb. 15	Konfokalmikroskopie von E.coli-Bakterien, welche den mCherry-Vektor oder den mCherry-GATA-3-Vektor enthalten	S. 67
Abb. 16	Analyse der Expression von mCherry in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels RT-PCR	S. 68
Abb. 17	Analyse der Expression von mCherry in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels qRT-PCR	S. 69
Abb. 18	Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels RT-PCR	S. 70
Abb. 19	Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem mCherry-Vektor bzw. mit dem mCherry-GATA-3-Vektor mittels qRT-PCR	S. 70

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 20	Analyse der Firefly-Luciferase-Aktivität in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und verschiedenen Transfektionsreagenzien im Vergleich mittels Lumineszenzspektroskopie	S. 72
Abb. 21	Analyse der Kinetik der Firefly-Luciferase-Aktivität in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und LT1 mittels Lumineszenzspektroskopie	S. 74
Abb. 22	Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und LT1 mittels RT-PCR	S. 74
Abb. 23	Analyse der Expression von GATA-3 in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und LT1 mittels qRT-PCR	S. 75
Abb. 24	Analyse der Vitalität der HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und hgd40 bzw. ODNg mittels LT1	S. 77
Abb. 25	Analyse der Vitalität der HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor mittels LT1 und hgd40 mittels Escort/Chloroquine (E/Ch)	S. 78
Abb. 26	Graphische Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse von Zellvitalität und Transfektionseffizienz nach Behandlung der HEK-293-Zellen mit FAMhgd40 und Escort/Chloroquine (E/Ch)	S. 79
Abb. 27	FACS-Analyse (Dot Blots und Histogramme) von Zellvitalität und Transfektionseffizienz nach Behandlung der HEK-293-Zellen mit FAMhgd40 und Escort/Chloroquine (E/Ch)	S. 80
Abb. 28	Analyse der Luciferase-Aktivität mittels Lumineszenzspektroskopie und der Expression von GATA-3 mittels qRT-PCR in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und Behandlung mit hgd40 <i>vor</i> dem Expressionsmaximum	S. 83
Abb. 29	Analyse der Luciferase-Aktivität mittels Lumineszenzspektroskopie und der Expression von GATA-3 mittels qRT-PCR in HEK-293-Zellen nach Transfektion mit dem psiCheck-GATA-3-Vektor und Behandlung mit hgd40 <i>nach</i> dem Expressionsmaximum	S. 84

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Behandlungsstufen des chronischen Asthma bronchiale	S. 17
Tab. 2	Mögliche systemische Nebenwirkungen der gebräuchlichsten β_2 -Sympathomimetika	S. 19
Tab. 3	PCR-Bedingungen	S. 40
Tab. 4	Transfektion mit LT1	S. 48
Tab. 5	Transfektion mit Escort/Chloroquine	S. 49
Tab. 6	Transfektionsreagenzien (TR): Gegenüberstellung von Vor- und Nachteilen	S. 95

9. Literaturverzeichnis

- 1) **Aalbers R, Boorsma M, van der Woude HJ, Jonkers RE.** Protective effect of budesonide/formoterol compared with formoterol, salbutamol and placebo on repeated provocations with inhaled AMP in patients with asthma: a randomised, double-blind, cross-over study. *Respir Res* 2010;11(1):66.
- 2) **Abdelgany A, Ealing J, Wood M, Beeson D.** Selective DNzyme-mediated cleavage of AChR mutant transcripts by targeting the mutation site or through mismatches in the binding. *J RNAi Gene Silencing*. Aug 2005; 1(1): 32-37.
- 3) **Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM.** Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst. Rev* 2010:CD001186.
- 4) **Abul-Hassan K, Walmsley R, Boulton M.** Optimization of non-viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 2000;20(5):361-6.
- 5) **Aggarwal A, Agrawal DK.** Importins and exportins regulating allergic immune responses. *Mediators inflamm* 2014, 2014: 476357.
- 6) **Ahlquist RP.** A study of the adrenotropic receptors. *Am . J . Physiol* 1948,153 586.
- 7) **Akdis, CA.** Allergy and hypersensitivity. Mechanisms of allergic disease. *Current Opinion in Immunology* 2006,18:718–726.
- 8) **Anandan C, Nurmatov U, van Schayck O, Sheikh A.** Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. *Allergy* 2010;65:152-167.
- 9) **Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A.** Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 2006;24:607-56.
- 10) **Attal J, Théron M, Rival S, Puissant C, Houdebine L.** The efficiency of different IRESs (Internal Ribosomes Entry Site) in monocistronic mRNAs. *Molecular Biology Reports* 2000;27:21–26.
- 11) **Aun MV, Ribeiro MR, Costa Garcia CL, Agondi RC, Kalil J, Giavina-Bianchi P.** Esophageal candidiasis – an adverse effect of inhaled corticosteroids therapy. *J Asthma*. 2009 May;46(4):399-401.
- 12) **Baltazar GC, Guha S, Lu W, Lim J, Boesze-Battaglia K, Laties AM, Puneet T, Kompella UB, Mitchell CH.** Acid nanoparticles are trafficked to lysosomes and restore an acidic lysosomal pH and degradative function to compromised ARPE-19 cells. *PLoS One*. 2012; 7(12): e49635.
- 13) **Barnes PJ.** Theophylline. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Mar; 3(3): 725–747.
- 14) **Barnes PJ.** How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology* 2006;148:245–254.
- 15) **Barnes PJ, Adcock IM.** How Do Corticosteroids Work in Asthma? *Ann Intern Med* 2003;139:359-370.
- 16) **Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD.** Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Nov;69(21):3613-34.
- 17) **Baum DA, Silverman SK.** Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Jul;65(14):2156-74.
- 18) **Berger S.** The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*.2007 May 24;447(7143):407-12.
- 19) **Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q.** Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6(3):301-5.

- 20) **Bochkov YA, Palmenberg AC.** Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location. *Biotechniques*. 2006 Sep;41(3):283-4, 286;288 passim.
- 21) **Bousquet J, Winchester C, Papi A, Virchow JC, Haughney J, Costa D, Usmani O, Bjermer L, Price D, on behalf of the Global Allergy and Asthma European Network (GA 2LEN).** Inhaled Corticosteroid/Long-Acting beta2-Agonist Combination Therapy for Asthma: Attitudes of Specialists in Europe. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;157:303–310.
- 22) **Breaker RR, Joyce GF.** A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chemistry & Biology* 1994;1:223-229.
- 23) **Breaker RR, Joyce GF.** A DNA enzyme with Mg²⁺-dependent RNA phosphoesterase activity. *Chemistry & Biology* 1995; 2:655-660.
- 24) **Brightling C, Berry M, Amrani Y.** Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2008 Jan;121(1):5-10.
- 25) **Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID.** Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002;346:1699–1705.
- 26) **Bresnick EH, Katsumura KR, Lee H-Y, Johnson KD, Perkins AS.** Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 13 5819-5831.
- 27) **Buels KS, Jacoby DB, Fryer AD.** Non-bronchodilating mechanisms of tiotropium prevent airway hyperreactivity in a guinea-pig model of allergic asthma. *Br J Pharmacol*. 2012 Mar; 165(5): 1501–1514.
- 28) **Burggraaf J, Westendorp RG, in't Veen JC, Schoemaker RC, Sterk PJ, Cohen AF, Blauw GJ.** Cardiovascular side effects of inhaled salbutamol in hypoxic asthmatic patients. *Thorax* 2001;56(7):567-9.
- 29) **Butcher SE, Pyle AM.** The Molecular Interactions That Stabilize RNA Tertiary Structure: RNA Motifs, Patterns, and Networks. *Acc Chem Res* 2011;44(12):1302-11.
- 30) **Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Sun LQ.** The Influence of Arm Length Asymmetry and Base Substitution on the Activity of the 10-23 DNA Enzyme. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000;10(5):323-32.
- 31) **Calixto M, Lintomen L, Schenka A, Saad M, Zanesco A, Antunes E.** Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *British Journal of Pharmacology* 2010;159:617–625.
- 32) **Camoretti-Mercado B.** Targeting the airway smooth muscle for asthma treatment. *Transl Res*. 2009 Oct;154(4):165-74.
- 33) **Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI.** Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*. 2010 Jul 1;127(1):1-8.
- 34) **Caramori G, Groneberg D, Ito K, Casolari P, Adcock IM, Papi A.** New drugs targeting Th2 lymphocytes in asthma. *J Occup Med Toxicol* 2008 Feb 27;3 Suppl 1:S6.
- 35) **Caramori G, Lim S, Ito K, Tomite K, Oates T, Jazrawi E, Chung KF, Barnes PJ and Adcock IM.** Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies *Eur Resp J* 2001;18:466-473.
- 36) **Cazzola M, Matera MG.** Safety of long-lasting beta2-agonists in the treatment of asthma. *Ther Adv Respir Dis*. 2007 Oct; 1(1):35-46.
- 37) **Chakraborty D, Collapardo-Guevara R, Wales DJ.** Energy landscapes, folding mechanisms, and kinetics of RNA tetraloop hairpins. *J Am Chem Soc*. 2014 Dec 31;136(52):18052-61.

9. Literaturverzeichnis

- 38) **Chan CT, Lieu M, Toh B-H, Kyaw TS, Bobik A, Sobey CG, Drummond GR.** Antibodies in the Pathogenesis of Hypertension. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:504045.
- 39) **Chandra M, Sachdeva A, Silverman SK.** DNA-catalyzed sequence-sepcific hydrolysis of DNA. *Nat Chem Biol.* 2009 Oct;5(10):718-20.
- 40) **Chase AJ, Semler BL.** Differential cleavage of IRES trans-acting factors (ITAFs) in cells infected by human rhinovirus. *Virology.* 2014 Jan 20;449:35-44.
- 41) **Chatila TA, Ning L, Garcia-Lloret M, Hyon-Jeen K, Nel AE.** T-cell effector pathways in allergic diseases: Transcriptional mechanisms and therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(4):812-23.
- 42) **Cheeks MC, Edwards AD, Arnot CJ, Slater NKH.** Gene transfection of HEK cells on supermacroporous polyacrylamide monoliths: a comparison of transient and stable recombinant protein expression in perfusion culture. *New Biotechnology* 2009;26:289-299.
- 43) **Chen YQ, Shi HZ.** CD28/CTLA-4-CD80/CD86 and ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. *Allergy.* 2006 Jan;61(1):15-26.
- 44) **Chenuet S, Martinet D, Besuchet-Schmutz N, Wicht M, Jaccard N, Bon AC, Derouazi M, Hacker DL, Beckmann JS, Wurm FM.** Calcium phosphate transfection generates mammalian recombinant cell lines with higher specific productivity than polyfection. *Biotechnol Bioeng.* 2008 Dec 1;101(5):937-45.
- 45) **Choosakoonkriang S, Lobo BA, Koe GS, Koe JG, Middaugh CR.** Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *J Pharm Sci* 2003;92(8):1710-22.
- 46) **Ciftci K, Levy RJ.** Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *International Journal of Pharmaceutics* 2001;218:81–92.
- 47) **Cochrane JC, Strobel SA.** Catalytic Strategies of Self-Cleaving Ribozymes. *Acc Chem Res.* 2008 Aug;41(8):1027-35.
- 48) **Crooke ST.** Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004;55:61-95.
- 49) **D'Amato G, Cecchi L, D'Amato M, Liccardi G.** Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20:95-102.
- 50) **Darcen-Nicolaisen Y, Meinicke H, Fels G, Hegend O, Haberland A, Kuehl A, Loddenkemper C, Witzernath M, Kube S, Henke W, Hamelmann E.** Small Interfering RNA against Transcription Factor STAT6 inhibits Allergic Airway Inflammation and Hyperreactivity in Mice. *J Immunol* 2009;182:7501-7508.
- 51) **Dean NM, Bennett CF.** Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 2003;22:9087–9096.
- 52) **Deutsche Atemwegsliga e.V.** Leitlinien 2006.
- 53) **Diamant Z, Boot JD, Virchow JC.** Summing up 100 years of asthma. *Respiratory Medicine* 2007;101:378–388.
- 54) **Dicke TM.** Charakterisierung GATA-3-spezifischer DNAsyme und Analyse der therapeutischen Wirksamkeit in experimentellen Modellen des allergischen Asthma bronchiale. Philipps-Universität Marburg: Medizin, 2009.
- 55) **Ding Y, Lawrence CE.** Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucleic Acids Res.* 2001 Mar 1;29(5):1034-46.

9. Literaturverzeichnis

- 56) **Doran G, Sohail M.** Systemic analysis of the role of target site accessibility in the activity of DNA enzymes. *J RNAi Gene Silencing*. 2006 Jul 28;2(2):205-14.
- 57) **Dossus L, Becker S, Achaintre D, Kaaks R, Rinaldi S.** Validity of multiplex-based assays for cytokine measurements in serum and plasma from "non-diseased" subjects: comparison with ELISA. *J Immunol Methods* 2009;350(1-2):125-32.
- 58) **Douwes J, Travier N, Huang K, Cheng S, McKenzie J, Le Gros G, von Mutius E, Pearce, N.** Lifelong farm exposure may strongly reduce the risk of asthma in adults. *Allergy* 2007;62:1158-1165.
- 59) **Duncan DC, Weeks KM.** Nonhierarchical ribonucleoprotein assembly suggests a strain-propagation model for protein-facilitated RNA folding. *Biochemistry*. 2010;49(26):5418-25.
- 60) **Durán MC, Willenbrock S, Barchanski A, Müller JM, Maiolini A, Soller JT, Barcikowski S, Nolte I, Feige K, Escobar HM.** Comparison of nanoparticle-mediated transfection methods for DNA expression plasmids: efficiency and cytotoxicity. *Journal of Nanobiotechnology* 2011; 9:47.
- 61) **Durham SR, Emminger W, Kapp A, Colombo G, de Monchy J, Rak S, Scadding GK, Andersen JS, Riis B, Dahl R.** Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *J Allergy Clin Immunol* 2010 Jan; 125(1):131-8.e1-7.
- 62) **Eastman S, Siegel C, Tousignant J, Smith AE, Cheng SH, Scheule RK.** Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997;1325:41–62.
- 63) **Ege MJ, Strachan DP, Cookson WOCM, Moffatt MF, Gut I, Lathrop M, Kabesch M, Genuneit J, Büchele G, Sozanska B, Boznanski A, Cullinan P, Horak E, Bieli C, Braun-Fahrlander C, Heederik D, von Mutius E.** Gene-environment interaction for childhood asthma and exposure to farming in central europe. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:138-44.
- 64) **Escoffre JM, Teissié J, Rols MP.** Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? *J Membr Biol*. 2010 Jul;236(1):61-74.
- 65) **European Community Respiratory Health Survey.** Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J* 1996;9:687–95.
- 66) **Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M.** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(21):7413-7.
- 67) **Ferreira JP, Overton KW, Wang CL.** Tuning gene expression with synthetic upstream open reading frames. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul 9, 2013;110(28): 11284-11289.
- 68) **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-11.
- 69) **Forsbach A, Müller C, Montino C, Kritzler A, Curdt R, Benahmed A, Jurk M, Vollmer J.** Impact of delivery systems on siRNA immune activation and RNA interference. *Immunol Lett*. 2012;141(2):169-80.
- 70) **Frandsen PM, Krohn IJ, Hoffmann HJ, Schiotz PO.** The Influence of IgE on Cultured Human Mast Cells. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013 Nov;5(6):409-14.
- 71) **Galli SJ et al.** Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749–786.
- 72) **Gell PGH, Coombs RRA.** Clinical aspects of immunology. Blackwell, London, 1963.
- 73) **Ghazawi I, Cutler SJ, Low P, Mellick AS, Ralph SJ.** Inhibitory effects associated with use of modified *Photinus pyralis* and *Renilla reniformis* luciferase vectors in dual reporter assays and implications for analysis of ISGs. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2005;25:92–102.

9. Literaturverzeichnis

- 74) **Global Initiative for Asthma (GINA) Report 2012.** Global Strategy for Asthma Management and Prevention (Update 2012).
- 75) **Global Initiative for Asthma (GINA) Report 2007.** Global Strategy for Asthma Management and Prevention.
- 76) **Goenka S, Kaplan MH.** Transkriptional regulation by STAT6. *Immunol Res.* May 2011; 50(1): 87-96.
- 77) **Goff SP, Berg P.** Construction of Hybrid Viruses Containing SV40 and a Phage DNA Segments and Their Propagation in cultured Monkey Cells. *Cell* 1976;9:695-705.
- 78) **Goldman SD, Funk RS, Rajewski RA, Krise JP.** Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes. *Bioanalysis.* Nov 2009; 1(8): 1445-1459.
- 79) **Gould HJ, Sutton BJ.** IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):205-17.
- 80) **Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA et al.** The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 2003;21:579–628.
- 81) **Gould SJ, Subramani S.** Firefly Luciferase as a Tool in Molecular and Cell Biology. *Analytical Biochemistry* 1988;175:5-13.
- 82) **Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn, R.** Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J gen Virol* 1977;36:59-74.
- 83) **Gray DM, Gray CW, Yoo BH, Loo TF.** Antisense DNA parameters derived from next-nearest-neighbor analysis of experimental data. *BMC Bioinformatics.* 2010 May 14;11:252.
- 84) **Greer LF, Szalay AA.** Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 2002;17:43–74.
- 85) **Guilbert T et al.** Long-Term Inhaled Corticosteroids in Preschool Children at High Risk for Asthma. *N Engl J Med.* 2006;354(19):1985-97.
- 86) **Guo H-W, Yun C-X, Hou G-H, Du J, Huang X, Lu Y, Keller E, Zhang J, Deng J-G.** Mangiferin attenuates Th1/Th2 Cytokines Imbalance in an ovalbumin-induced mouse model. *PLoS One.* 2014; 9(6):e100394.
- 87) **Halpin D.** Tiotropium in asthma: what is the evidence and how does it fit in? *World Allergy Organ J.* 2016; 9(1): 29.
- 88) **Halpin DM, Vogelmeier C, Pieper MP, Metzendorf N, Richard F, Anzueto A.** Effect of tiotropium on COPD exacerbations: A systematic review. *Respir Med.* 2016 May;114:1-8. doi: 10.1016/j.rmed.2016.02.012.
- 89) **Hammad, H, Lambrecht BN.** Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:331–336.
- 90) **Hansen RA, Tu W, Wang J, Ambuehl R, McDonald CJ, Murray MD.** Risk of adverse gastrointestinal events from inhaled corticosteroids. *Pharmacotherapy* 2008;28(11):1325-34.
- 91) **Hasbrouck NC, High KA.** AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects. *Gene Ther.* 2008 Jun;15(11):870-5.
- 92) **Hawkins E, Beck M, Butler B, Wood K.** Increased Renilla Luciferase Sensitivity in the Dual-Luciferase® Reporter Assay System. *Promega Notes* 2003;85:31-33.
- 93) **Hele DJ, Birrell MA, Webber SE, Foster M, Belvisi MG.** Mediator involvement in antigen-induced bronchospasm and microvascular leakage in the airways of ovalbumin sensitized Brown Norway rats. *British Journal of Pharmacology* 2001;132:481–488.

9. Literaturverzeichnis

- 94) **Hizawa N.** Beta-2 adrenergic receptor genetic polymorphisms and asthma. *J Clin Pharm Ther.* 2009 Dec;34(6):631-43.
- 95) **Holgate ST.** Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med.* 2012 May 4;18(5):673-83.
- 96) **Holgate ST.** Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Sep;128(3):495-505.
- 97) **Holgate ST, Polosa R.** Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2008;8:218-30.
- 98) **Hon KL, Leung TF, Leung AK.** Clinical effectiveness and safety of montelukast in asthma. What are the conclusions from clinical trials and meta-analysis? *Drug Des Devel Ther.* 2014 Jun 26;8:839-850.
- 99) **Hong Y, Chen S, Gui J, Scharl M.** Retention of the developmental pluripotency in medaka embryonic stem cells after gene transfer and long-term drug selection for gene targeting in fish. *Transgenic Res* 2004;13(1):41-50.
- 100) **Hoskins C, Cuschieri A, Wang L.** The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. *J Nanobiotechnology* 2012;10(1):15.
- 101) **Hostmann, A.** Entwicklung einer therapeutischen Strategie bei Allergie und Asthma unter Einsatz von Ribozymen und DNAzymen. Freie Universität Berlin: Medizin, 2008.
- 102) **Houseley J, Tollervey D.** The many pathways of RNA degradation. *Cell.* 2009 Feb 20;136(4):763-76.
- 103) **Huotari J, Helenius A.** Endosome maturation. *EMBO J.* Aug 31, 2011; 30(17): 3481-3500.
- 104) **Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH.** T Helper Cell Fate Specified by Kinase-Mediated Interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 2005;307 (5708):430-433.
- 105) **Incorvaia C, Mauro M, Riaro-Sforza GG, Frati F, Tarantini F, Caserini M.** Current and future applications of the anti-IgE antibody omalizumab. *Biologics.* 2008 Mar;2(1):67-73.
- 106) **International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee.** Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998;351:1225–32.
- 107) **Ito K, Herbert C, Siegle JS, Vuppusetty C, Hansbro N, Thomas PS, Foster PS, Barnes PJ, Kumar RK.** Steroid-resistant neutrophilic inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39(5):543-50.
- 108) **Jain S, Kumar S, Agrawal AK, Thanki K, Banerjee UC.** Enhanced transfection efficiency and reduced cytotoxicity of novel lipid-polymer hybrid nanoplexes. *Mol Pharm.* 2013 Jun 3;10(6):2416-25.
- 109) **Jang SK, Kraeusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E.** A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol.* Aug 1988;62(8): 2636-2643.
- 110) **Jaton K, Ninet B, Bille J, Greub G.** False-negative PCR result due to gene polymorphism: the example of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4590-1.
- 111) **Jenner RG, Townsend MJ, Jackson I, Sun K, Bouwman RD, Young RA, Glimcher L, and Lord GM.** The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17876–17881.

9. Literaturverzeichnis

- 112) **Jung J, Han KY, Koh HR, Lee J, Choi YM, Kim C, Kim SK.** Effekt of single-base mutation on activity and folding of 10-23 desoxyribozyme studied by three-color single-molecule ALEX-FRET. *J Phys Chem B.* 2012 Mar 8;116(9):3007-12.
- 113) **Kallergis EM, Manios EG, Kanoupakis EM, Schiza SE, Mavrakis HE, Klapsinos NK, Vardas PE.** Acute electrophysiologic effects of inhaled salbutamol in humans. *Chest* 2005;127(6):2057-63.
- 114) **Kang HR, Kwon YH, Kim YJ.** A case of oesophageal candidiasis in an adolescent who had frequently received budesonide nebulizing therapy. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013 Sep;16(3):185-9.
- 115) **Kautzky H.** Quenching of luminescence by oxygen. *Trans Faraday Soc* 1939;35:216-219.
- 116) **Kearns MD, Yesha NP, Michalakis S.** Physicochemical characteristics associated with transfection of cationic-based gene delivery vectors in the presence of DOPE. *Chem Phys Lipids.* Nov 2010; 163(8): 755-764.
- 117) **Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H.** Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev.* 2006 Mar;58(1):32-45.
- 118) **Kierzek E, Kierzek R, Turner DH, Catrina IE.** Facilitating RNA-Structure Prediction with Microarrays. *Biochemistry.* Jan 17, 2006;45(2):581-593.
- 119) **Kim YH, Park JH, Lee M, Kim YH, Park TG, Kim SW.** Polyethylenimine with acid-labile linkages as a biodegradable gene carrier, *J Control Release* 2005;103:209–219.
- 120) **Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV.** A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Müller cells. *PLoS One* 2009;4(10):e7467.
- 121) **Komar AA, Hatzoglou M.** Internal Ribosome Entry Sites in Cellular mRNAs: Mystery of Their Existence. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:23425-23428.
- 122) **Krishnan Y, Simmel FC.** Nucleic acid based molecular devices. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011 Mar 28;50(14):3124-56.
- 123) **Krug N, Hohlfeld JM, Kirsten AM, Kornmann O, Beeh KM, Kappeler D, Korn S, Ignatenko S, Timmer W, Rogon C, Zeitvogel J, Zhang N, Bille J, Homburg U, Turowska A, Bachert C, Werfel T, Buhl R, Renz J, Garn H, Renz H.** Allergen-induced asthmatic responses modified by a GATA3-specific DNzyme. *N Engl J Med.* 2015 May 21;372(21):1987-95. doi: 10.1056/NEJMoa1411776.
- 124) **Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I.** Pathology of asthma. *Front Microbiol.* 2013 Sep 10;4:263.
- 125) **Kurreck J.** Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications *Eur. J. Biochem.* 2003;270,1628–1644.
- 126) **Kurreck J, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA.** Comparative Study of DNA Enzymes and Ribozymes against the Same Full-Length Messenger RNA of the Vanilloid Receptor Subtype I. *J Biol Chem* 2002;277 (9):7099-7107.
- 127) **Lam JC, Withers JB, Li Y.** A complex RNA-Cleaving DNzyme that can efficiently cleave a pyrimidine-pyrimidine junction. *J Mol Biol.* 2010 Jul 23;400(4):689-701.
- 128) **Lan T, Lu Y.** Metal ion-dependent DNzymes and their applications as biosensors. *Met Ions Life Sci* 2012;10:217-48.
- 129) **Lee KC, Bates CE, Lipworth BJ.** Acute systemic effects of inhaled salbutamol in asthmatic subjects expressing common homozygous β_2 -adrenoreceptor haplotypes at positions 16 and 27. *Br J Clin Pharmacol.* Jan 2004;57(1):100-104.

9. Literaturverzeichnis

- 130) **Leu K, Obermayer B, Rajamani S, Gerland U, Chen IA.** The prebiotic evolutionary advantage of transferring genetic information from RNA to DNA. *Nucleic Acids Res.* Oct 2011; 39(18): 8135-8147.
- 131) **Lewin AS, Hauswirth WW.** Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 2001;7(5):221-8.
- 132) **Linak MC, Tourdot R, Dorfman KD.** Moving beyond Watson-Crick models of coarse grained DNA dynamics. *J Chem Phys.* 2011 Nov 28;135(20):205102.
- 133) **Lippincott-Schwartz J, Patterson GH.** Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 2003;300(5616):87-91.
- 134) **Lipworth BJ, McDevitt DG.** Inhaled beta 2-adrenoceptor agonists in asthma: help or hindrance? *Br J Clin Pharmacol* 1992;33(2):129-38.
- 135) **Liu D, Ahmet A, Ward L, Krishnamoorthy P, Mandelcorn ED, Leigh R, Brown JP, Cohen A, Kim H.** A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2013 Aug 15;9(1):30.
- 136) **Loubaki L, Hadj-Salem I, Fakhfakh R, Jacques E, Plante S, Boisvert M, Aoudjit F, Chakir J.** Co-Culture of Human Bronchial Fibroblasts and CD4+ T Cells Increases Th17 Cytokine Signature. *PLoS One.* 2013 Dec 5;8(12):e81983.
- 137) **Lyakh L, Trinchieri G, Provezza L, Carra G, Gerosa F.** *Immunol Rev.* 2008 December; 226: 112–131.
- 138) **Marcon A, Corsico A, Cazzoletti L, Bugiani M, Accordini S, Almar E, Cerveri I, Gislason D, Gulsvik A, Janson C, Jarvis D, Martinez-Moratalla J, Pin I, de Marco R and ECRHS.** Body mass index, weight gain, and other determinants of lung function decline in adult asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009;123:1069.
- 139) **Maris NA, de Vos AF, Dressing MC et al.** Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:878-884.
- 140) **Martínez-Salas E, Lozano G, Fernandez-Chamorro J, Francisco-Velilla R, Galan A, Diaz R.** RNA-binding proteins impacting on internal initiation of translation. *Int J Mol Sci.* 2013 Nov 1;14(11):21705-26.
- 141) **Martino S, di Girolamo I, Tiribuzi R, D'Angelo F, Datti A, Orlacchio A.** Efficient siRNA delivery by the cationic liposome DOTAP in human hematopoietic stem cells differentiating into dendritic cells. *J Biomed Biotechnol* 2009;2009:410260.
- 142) **Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R and Global Initiative for Asthma (GINA) Program.** The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* 2004;59:469–478.
- 143) **Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, Gruenert DC.** Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol* 2010;10:9.
- 144) **McFadden.** A Century of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004;170:215-221.
- 145) **McMillan SJ, Xanthouw G, Lloyd CM.** Therapeutic administration of Budesonide ameliorates allergen-induced airway remodelling. *Clin Exp Allergy* 2005;35:388–396.
- 146) **McNabb DS, Reed R, Marciniak RA.** Dual Luciferase Assay System for Rapid Assessment of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eucaryotic Cell* 2005:1539–1549.
- 147) **McQuisten KA, Peek AS.** Identification of sequence motifs significantly associated with antisense activity. *BMC Bioinformatics.* 2007 Jun 7;8:184.

9. Literaturverzeichnis

- 148) **Menzella F, Lusuardi M, Galeone C, Taddei S, Zucchi L.** Profile of anti-IL-5 mAb mepolizumab in the treatment of severe refractory asthma and hypereosinophilic diseases. *J Asthma Allergy*. 2015; 8: 105–114.
- 149) **Mohrs K, Wakil AE, Killeen N, Locksley RM, Mohrs M.** A two-step process for cytokine production revealed by IL-4 dual-reporter mice. *Immunity* 2005;23(4):419-29.
- 150) **Morrey ME, Anderson PA, Chambers G, Paul R.** Optimizing nonviral-mediated transfection of human intervertebral disc chondrocytes. *The Spine Journal* 2008;8:796–803.
- 151) **Mosmann T, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 1986;136(7):2348–2357.
- 152) **Moss WN, Lee N, Pimienta G, Steitz JA.** RNA families in Epstein-Barr virus. *RNA Biol*. 2014 Jan;11(1):10-7.
- 153) **Mulholland DJ, Cox M, Read J, Rennie P, Nelson C.** Androgen responsiveness of Renilla luciferase reporter vectors is promoter, transgene and cell line dependent. *The Prostate* 2004;59:115-119.
- 154) **Murdoch JR, Lloyd CM.** Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res*. 2010 August 7; 690(1-2): 24–39.
- 155) **Murphy KM, Stephen LR.** The lineage decisions of Helper T Cells. *Nature Reviews Immunology* 2002;2:933-944.
- 156) **Nakamura Y, Ghaffar O, Olvenstein R, Tehe RA, Soussi-Gounni A, Zhang OH, Ray A, Hamid Q.** Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:215-222.
- 157) **Nakanishi K.** Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr Opin Immunol* 2010;22(6):814-20.
- 158) **Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ.** Comparison of the effects of salmeterol and formoterol in patients with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:A190.
- 159) **Niimi A.** Cough, asthma and cysteinyl-leukotriens. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013 Oct;26(5):514-9.
- 160) **Nino G, Hu A, Grunstein JS, Grunstein MM.** Mechanism regulating proasthmatic effects of prolonged homologous β^2 -adrenergic receptor desensitization in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Oct 2009; 297(4): L746-L757.
- 161) **Nolan T, Hands RE, Bustin SA.** Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1(3):1559-82.
- 162) **Normansell A, Walker S, Milan SJ, Walthers EH, Nair P.** Omalizumab for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Jan 13;1:CD003559.
- 163) **Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Kobayashi H.** H-type dimmer formation of fluorophores: a mechanism for activatable, in vivo optical molecular imaging. *ACS Chem Biol*. 2009 Jul 17;4(7):535-46.
- 164) **Parmentier CN, Fuerst E, McDonald J, Bowen H, Lee TH, Pease JE, Woszczeck G, Cousins DJ.** Human T(H)2 cells respond to cysteinyl leukotrienes through selective expression of cysteinyl leukotriene receptor1. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Apr;129(4):1136-42.
- 165) **Payne AJ, Gerdes BC, Kaja S, Koulen P.** Insert sequence length determines transfection efficiency and gene expression levels in bicistronic mammalian expression vectors. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013 Dec 15;4(4):201-8.
- 166) **Pelletier J, Sonnenberg N.** Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988;334:320-325.

9. Literaturverzeichnis

- 167) **Perez DM, Doze VA.** Cardiac and neuroprotection regulated by α_1 -adrenergic receptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res* 2011;31(2):98-110.
- 168) **Perrella G, Lopez-Vernaza MA, Carr C, Sani E, Gosselé V, Verduyn C, Kellermeier F, Hannah MA, Amtmann A.** Histone deacetylase complex1 expression level titrates plant growth and abscisic acid sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell*.2013 Sep;25(9):3491-505.
- 169) **Plank T-D M, Whitehurst JT, Kieft JS.** Cell type specificity and structural determinants of IRES activity from the 5' leaders of different HIV-1 transcripts. *Nucleic Acids Res.* Jul 2013; 41(13): 6698-6714.
- 170) **Price D, Fromer L, Kaplan A, van der Molen T, Román-Rodríguez M.** Is there a rationale and role for long-acting anticholinergic bronchodilators in asthma? *NPJ Prim Care Respir Med.* 2014; 24: 14023.
- 171) **Radovanovic D, Santus P, Blasi F, Mantero M.** The evidence on tiotropium bromide in asthma: from the rationale to the bedside. *Multidiscip Respir Med.* 2017; 12: 12.
- 172) **Rank MM, Murray KC, Stephens MJ, D'Amico J, Gorassini MA, Bennett DJ.** Adrenergic receptors modulate motoneuron excitability, sensory synaptic transmission and muscle spasms after chronic spinal cord injury.. *J Neurophysiol* 2011 Jan; 105(1):410-22.
- 173) **Rattan R, Vaidyanathan S, Wu GS, Shakya A, Orr BG, Banaszak MM.** Polyplex-induced cytosolic nuclease activation leads to differential transgene expression. *Mol Pharm.* Aug 5, 2013; 10(8): 3013-3022.
- 174) **Ray A. and Cohn L.** Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *NJ. Clin. Invest* 1999;104(8):985-993.
- 175) **Reese JC.** Basal transcription factors. *Curr Opin Genet Dev,* 13:2003:114-118.
- 176) **Resnier P, Montier T, Mathieu V, Benoit J-P, Passirani C.** A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials.* 2013 Sep;34(27):6429-43.
- 177) **Riedler J, Braun-Fahrlaender C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr S, Schierl R, Nowak D, von Mutius E and The ALEX Study Team.** Early life exposure to farming provides protection against the development of asthma and allergy. *Lancet* 2001;358:1129–1133.
- 178) **Romagnani S.** The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;18:263–6.
- 179) **Romagnani S.** Regulation of the T-cell response. *Clin Exp Allergy* 2006;36:1357–1366.
- 180) **Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA.** How TCRs Bind MHCs, Peptides, and Coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 2006. 24:419–466.
- 181) **Saffran HA, Read GS, Smiley JR.** Evidence for translational regulation by the herpes simplex virus virion host shutoff protein. *J Virol.* 2010 Jun;84(12):6041-9.
- 182) **Salter HH.** On asthma: its pathology and treatment. London: John Churchill; 1860 limitations. *Chest* 1997;111(2):17S–26S. (*Zitiert in McFadden, s. 144*)
- 183) **Santoro SW, Joyce GF.** A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4262-4266.
- 184) **Schubert S, Fürstle JP, Werk D, Grunert HP, Zeichhardt H, Erdmann VA, Kurreck J.** Gaining target access for desoxyribozymes. *J Mol Biol.* 2004 May 28;339(2):355-63.
- 185) **Schubert S, Gul DC, Grunert HP, Zeichhardt H, Erdmann VA, Kurreck J.** RNA cleaving '10-23' DNazymes with enhanced stability and activity. *Nucleic Acids Res* 2003;31:5982-92.
- 186) **Schulze A, van Strien RT, Praml G, Nowak D, Radon K.** Characterisation of asthma among adults with and without childhood farm contact. *Eur Respir J* 2007;29:1169-1173.

9. Literaturverzeichnis

- 187) **Sel S, Wegmann M, Dicke T, Sel Saper, Henke W, Yildirim A, Renz H, Garn H.** Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNzyme. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(4):910-916.
- 188) **Shahidullah K, London E.** Effect of lipid composition on the topography of membrane-associated hydrophobic helices: stabilization of transmembrane topography by anionic lipids. *J Mol Biol* 2008;379(4):704-718.
- 189) **Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY.** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2005;2(12):905-9.
- 190) **Shifera AS, Hardin JA.** Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Anal Biochem.* 2010 January 15; 396(2): 167-172.
- 191) **Siddiqui S, Sutcliffe A, Shikotra A, Woodman L, Doe C, McKenna S, Wardlaw A, Bradding P, Pavord I, Brightling C.** Vascular remodeling is a feature of asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:813-819.
- 192) **Silva IJ, Saramago M, Dressaire C, Dominiques S, Viegas SC, Arraiano CM.** Importance and key events of prokaryotic RNA decay: the ultimate fate of an RNA molecule. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2011 Nov-Dec;2(6):818-36.
- 193) **Singh V, Agrewala JN.** Regulatory role of pro-Th1 and pro-Th2 cytokines in modulating the activity of Th1 and Th2 cells when B cell and macrophages are used as antigen presenting cells. *BMC Immunol* 2006;7:17.
- 194) **Sioud M, Iversen PO.** Ribozymes, DNzymes and Small Interfering RNAs as Therapeutics. *Current Drug Targets* 2005;6:647-653.
- 195) **Smeeth L, Boulis M, Hubbard R, Fletcher AE.** A population based case-control study of cataract and inhaled corticosteroids. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1247-1251.
- 196) **Smirnikhina SA, Lavrov AV, Bochkov NP.** Dynamics of Elimination of Plasmids and Expression of VEGF121 Gene Transfected into Human Mesenchymal Stem Cells by Different Methods. *Cell Technologies in Biology and Medicine* 2011;151(1):121-5.
- 197) **Southward CM, Surette MG.** The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. *Molecular Microbiology* 2002;45(5):1191-1196.
- 198) **Statistisches Bundesamt Deutschland (2010)** Kapitel Gesundheit aus dem Statistischen Jahrbuch 2010.
- 199) **Stein CA.** The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed. *J Clin Invest* 2001;108:641-644.
- 200) **Stephenson EM.** Locomotory invasion of human cervical epithelium and avian fibroblasts by HeLa cells in vitro. *J Cell Sci* 1982;57:293-314.
- 201) **Storno GD.** An overview of RNA structure prediction and applications to RNA gene prediction and RNAi design. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2006 Mar;Chapter 12:Unit 12.1.
- 202) **Strachan, DP.** Hay fever, hygiene and household size. *Br Med J* 1989;299:1259-1260.
- 203) **Sutherland ER, Lehman EB, Teodorescu M, Wechsler ME.** Body mass index and phenotype in subjects with mild-to-moderate persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009;123(6):1328-1334.
- 204) **Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH.** Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003;21:713-58.

9. Literaturverzeichnis

- 205) **Tabatt K, Kneuer C, Sameti M, Olbrich C, Müller RH, Lehr CM, Bakowsky U.** Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes. *Journal of Controlled Release* 2004;97:321–332.
- 206) **Tan SS, Kim SJ, Kool ET.** Differentiating between fluorescence-quenching metal ions with polyfluorophore sensors built on a DNA backbone. *J Am Chem Soc* 2011;133(8):2664-71.
- 207) **Thomas MC, Chiang CM.** The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41:2006:105-178.
- 208) **Tian X, Tian X, Bo J, Li S, Liu Z and Niu B.** Inhibition of allergic airway inflammation by antisense-induced blockade of STAT6 expression. *Chin Med J* 2011;124(1):26-31.
- 209) **Trevor JL, Deshane JS.** Refractory asthma: mechanisms, targets, and therapy. *Allergy*. 2014 Jul; 69(7):817-27.
- 210) **Tsien RY.** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998;67:509-44.
- 211) **Tsoukas MA, Krishnamoorthy P, Richards BJ, Pepe C, Christopoulos S.** Adrenal suppression with cushingoid features from inhaled corticosteroid therapy in an adult asthmatic patient. *Am J Med*. 2014 May;127(5):e1-2.
- 212) **Tu GC, Cao QN, Zhou F, Israel Y.** Tetranucleotide GGGA motif in primary RNA transcripts. Novel target site for antisense design. *J Biol Chem* 1998;273(39):25125-31.
- 213) **Valenta R.** The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature Rev Immunol*. 2002;2:446-453.
- 214) **Van Raalte DH, Diamant M.** Steroid diabetes: from mechanism to treatment? *Neth J Med*. 2014 Feb;72(2):62-72.
- 215) **Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C.** Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2005;20(8):1487-94.
- 216) **Vickers TA, Freier SM, Bui HH, Watt A, Crooke ST.** Targeting of repeated sequences unique to a gene results in significant increases in antisense oligonucleotide potency. *PLoS One*. 2014 Oct 15;9(10):e110615.
- 217) **Visitsunthorn N, Chirdjirapong V, Pootong V, Jirapongsananuruk O, Pacharn P, Weeravejsukit S, Mahakittikun V, Vichyanond P.** The accumulation of dust mite allergens on mattresses made of different kinds of materials. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2010;28(2-3):155-61.
- 218) **von Mutius E, Radon K.** Living on a Farm: Impact on Asthma Induction and Clinical Course. *Immunol Allergy Clin N Am* 2008;28:631-647.
- 219) **Vyas JM, Van der Veen AG, Ploeg HL.** The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Aug;8(8):607-18.
- 220) **Walford H, Doherty TA.** STAT6 and lung inflammation. *JAKSTAT*. Oct 1, 2013; 2(4):e25301.
- 221) **Walsh G.** An update on emerging drugs for asthma. *Expert opin Emerg Drugs*. 2012 Mar; 17(1):37-42.
- 222) **Wang J, Lu J, Gu G, Liu Y.** In vitro DNA-binding profile of transcription factors: methods and new insights. *J Endocrinol*. 2011 Jul;210(1):15-27.
- 223) **Wang YF, Shen JN, Shang XF, Wang J, Li JC, Yin JQ, Zou CY.** Ezrin mRNA target site selection for DNazymes using secondary structure and hybridization thermodynamics. *Tumour Biol*. 2011 Aug;32(4):809-17.
- 224) **Ward C, Walters H.** Airway wall remodelling: the influence of corticosteroids. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5(1): 438.

9. Literaturverzeichnis

- 225) **Warfield KL, Swenson DL, Olinger GG, Nichols DK, Pratt WD, Blouch R, Stein DA, Aman MJ, Iversen PL, Bavari S.** Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog.* 2006;2(1):e1.
- 226) **Witt N, Rodger G, Vandesompele J, Benes V, Zumla A, Rook GA, Huggett JA.** An Assessment of Air As a Source of DNA Contamination Encountered When Performing PCR. *J Biomol Tech* 2009;20(5):236–240.
- 227) **Wong CS, Pavord ID, Williams J, Britton JR, Tattersfield AE.** Bronchodilator, cardiovascular, and hypokalaemic effects of fenoterol, salbutamol, and terbutaline in asthma. *Lancet* 1990;336(8728):1396-9.
- 228) **Wong-Bazea C, Bustos I, Serna M, Tescucano A, Alcántara-Farfán V, Ibáñez M, Montañez C, Wong C, Baeza I.** Membrane fusion inducers, chloroquine and spermidine increase lipoplex-mediated gene transfection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;396:549–554.
- 229) **Wu B, Chen Y, Müller JD.** Fluorescence fluctuation spectroscopy of mCherry in living cells. *Biophysical Journal* 2009;96:2391–2404.
- 230) **Wu H, Lima WF, Zhang H, Fan A, Sun H, Crooke ST.** Determination of the role of the human Rnase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem* 2004;279:17181-9.
- 231) **Xiang YZ.** Adrenoreceptors, platelet reactivity and clopidogrel resistance. *Thromb Haemost* 2008 Nov;100(5):729-30.
- 232) **Yasukawa A, Hosoki K, Toda M, Miyake Y, Matsushima Y, Matsumoto T, Boveda-Ruiz D, Gil-Bernabe P, Nagao M, Sugimoto M, Hiraquchi Y, Tokuda R, Naito M, Takaqi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Suga S, Kobavashi T, Fujisawa T, Taquchi O, Gabazza EC.** Eosinophils promote epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells. *PLoS One* 2013 May 21;8(5):e64281.
- 233) **Young-Cheol L.** *Int J Biomed Sci.* 2008 March; 4(1): 8–13.
- 234) **Zamecnik PC, Stephenson ML.** Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1978;75(1):280-4.
- 235) **Zamore PD.** Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science.* 2002 May 17;296(5571):1265-9.
- 236) **Zhang Y, Yu LC.** Microinjection as a tool of mechanical delivery. *Current Opinion in Biotechnology* 2008;19(5):506-510.
- 237) **Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE.** *Cell Res* 2006;16:3-10.
- 238) **Zhu J, Yamane H, Paul WE.** . *Annu Rev Immunol.* 2010; 28: 445–489.

10. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Doktoren, Professoren und Dozenten in Marburg:

Adamkiewicz, Alter, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Garn, Gerdes, C. Görk, K. Görk, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hamer, Hertl, Heverhagen, Höffken, Hoyer, Jerrentrupp, Kalinowski, Kann, Kanngieser, Kill, Klenk, Klose, König, Kolb-Niemann, Koolman, Krieg, Kroll, Krones, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Maier, Mandrek, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Pfützner, Ramaswamy, Renz, Richter, Riße, Röhm, Röper, Rominger, Rothmund, Ruchholtz, J. Schäfer, H. Schäfer, Schlosser, Schmidt, Schrader, Steiniger, Steinkamp, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin.

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Holger Garn angefertigt. Bei ihm möchte ich mich herzlich für die geduldige wissenschaftliche Betreuung, stets freundliche und verständnisvolle Unterstützung, für die Diskussionsbereitschaft, konstruktive Kritik und Durchsicht dieser Arbeit bedanken. Herrn Prof. Dr. Harald Renz gebührt mein Dank für die Bereitstellung des interessanten Themas und aller nötigen Materialien.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Tanja Dicke, die mich mit fachlicher Kompetenz und Geduld in die wissenschaftliche Arbeit eingeführt und bis zur Fertigstellung der Dissertation mit nicht zuletzt freundschaftlichem Beistand begleitet hat.

Herzlichen Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe! Besonders danken möchte ich Wilma Hastedt für die Hilfe bei der Kultivierung der Zellen, Anja Spies-Naumann für Rat und Tat, Ayse Kilic, Stephanie Brand und Agnieszka Turowska für viele hilfreiche Ratschläge und meinem Mitdoktoranden Matthias Schiller für die Hilfe beim FACS.

Die konfokale Mikroskopie war nur mit Hilfe von Dr. Olivia Merkel im Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie Marburg möglich gewesen. Vielen Dank für die vielen interessanten und immer sehr kurzweiligen Stunden am Mikroskop.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden für die vielen offenen Ohren und die schöne gemeinsame Zeit während des Studiums und darüber hinaus. Hier möchte ich besonders meine WG erwähnen, die einfach einzigartig und mir eine zweite Familie war.

Mille grazie al mio caro Matteo e alla sua famiglia! Senza di voi non avrei mai finito...

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Der Weg bis hierher wäre niemals möglich gewesen ohne die stetige Begleitung durch meine Geschwister, Großeltern und alle anderen Mitglieder unserer großen Familie.

Besonders danken möchte ich aber meinen Eltern, ohne deren Liebe, Vertrauen und bedingungslose Unterstützung diese Dissertation und überhaupt meine Ausbildung und unvergesslich schöne Zeit in Marburg nie möglich gewesen wären.